



# Développement de méthodes de référence pour les biomarqueurs du bilan lipidique : application au contrôle qualité en biologie clinique

Maud Heuillet

## ► To cite this version:

Maud Heuillet. Développement de méthodes de référence pour les biomarqueurs du bilan lipidique : application au contrôle qualité en biologie clinique. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2013. Français. NNT : 2013DIJOS057 . tel-01124212

**HAL Id: tel-01124212**

**<https://theses.hal.science/tel-01124212>**

Submitted on 6 Mar 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# UNIVERSITE DE BOURGOGNE

Unité LNC-Lipides Nutrition Cancer – INSERM UMR 866  
Université de Bourgogne

Département « Biomédical et Chimique Organique »  
Laboratoire national de métrologie et d'essais  
1 rue Gaston Boissier – 75724 Paris Cedex 15

## THESE

Pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Bourgogne  
Discipline : Sciences Vie

Par  
Maud HEUILLET

Le 13 décembre 2013

## ***Développement de méthodes de référence pour les biomarqueurs du bilan lipidique : Application au contrôle qualité en biologie clinique***

Directeur de thèse :  
Pr. Laurence DUVILLARD

Co-encadrant de thèse :  
Dr. Vincent DELATOUR

### **Jury :**

Pr. Philippe GAMBERT  
Pr. Dominique BONNEFONT-ROUSSELOT  
Pr. Nader RIFAI  
Dr. Ingrid ZEGERS  
Pr. Philippe GILLERY

Président du jury  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur



*A ma famille,*





# Remerciements

Ces travaux de thèse n'auraient jamais pu voir le jour sans l'aide de nombreuses personnes que je souhaite tout particulièrement remercier.

Tout d'abord, je tiens à remercier ma directrice de thèse Laurence Duvillard pour son soutien et ses conseils durant ces trois années de thèse ainsi que sa grande disponibilité malgré la distance qui sépare Paris à Dijon.

Je voudrais également remercier Vincent Delatour, mon co-encadrant au sein du LNE, pour son aide précieuse et sa confiance qui m'ont permis de progresser tout au long de cette thèse et d'arriver au terme de ces travaux. Je n'oublierai pas nos grandes discussions qui apportaient de nombreuses réponses et pleins d'autres questions et qui faisaient également une envieuse de l'équipe de chimie inorganique que je n'oserai pas citer.

Merci à Béatrice Lalere et Sophie Vaslin-Reimann pour m'avoir offert la chance de travailler au LNE et pour leur implication dans mon projet de thèse.

Je remercie également les membres du jury, d'avoir eu la gentillesse de lire et d'évaluer mon travail de thèse.

Un grand merci à tous mes collègues au LNE pour leur accueil chaleureux et leur soutien, et plus particulièrement aux piliers de la chimie organique et inorganique Véronique Lediouren et Caroline Oster. Mon expatriation en terre Parisienne n'aurait pas été aussi facile sans vous.

Je n'oublie pas mon co-thésard Vincent Brieudes pour sa patience au quotidien et nos nombreux fous rires, Anaïs Rincel et Anne-Lise Borlot pour nos grandes discussions autour d'un café et bien évidemment Maryline Peignaux responsable de la plateforme analytique, qui m'a tout appris et sans qui je ne serai pas là aujourd'hui.

Je tiens également à remercier Jean-Paul Pais de Barros et Anne Athias de m'avoir si bien accueilli au sein de la plateforme de lipidomique de Dijon et pour leurs précieux conseils. J'ai beaucoup appris sur l'analyse des lipoprotéines grâce à vous.

Je remercie enfin mes meilleurs amis Stéphanie et Kevin ainsi que mes parents et toute ma famille, qui m'ont toujours soutenu et leur réconforté dans les moments difficiles.

Je voudrais simplement terminer en remerciant Julien pour son soutien sans faille. Ca n'a pas du être tous les jours facile de me supporter, surtout durant les dernières semaines.

# Résumé

En biologie clinique, il est indispensable de disposer de mesures fiables et comparables dans le temps et entre les laboratoires afin de permettre un dépistage et un suivi appropriés des patients. Pour cela, il est indispensable d'établir leur traçabilité métrologique aux unités du système international notamment par des méthodes de référence primaires ou des matériaux de référence certifiés (MRC) d'ordre supérieur.

Ces travaux de thèse ont consisté à développer et valider des méthodes de référence pour le cholestérol total, les triglycérides, le HDL-cholestérol et le LDL-cholestérol. Leur valeur ajoutée par rapport à une valeur consensuelle a été démontrée lors d'évaluations externes de la qualité. Elles ont également permis de certifier un MRC qui pourra être utilisé pour le contrôle qualité et/ou l'étalonnage des méthodes de routine. Nous avons montré que le MRC était commutable pour la plupart des méthodes de routine pour les différents biomarqueurs, ce qui a permis de l'utiliser pour évaluer leur justesse. Les méthodes de routine avaient généralement tendance à sous-estimer la concentration en triglycérides (en particulier aux valeurs basses) et à surestimer nettement la concentration de cholestérol total et de LDL-cholestérol (en particulier aux concentrations proches du seuil de décision clinique), ce qui se traduit par une augmentation du nombre de faux-positifs (patients traités à tort). Une approche de correction de non commutabilité a également été proposée afin de permettre l'utilisation de matériaux non commutables pour évaluer la justesse. Pour conclure, ces travaux ont démontré l'importance de disposer de méthodes de référence ainsi que de MRC commutables.

## Mots clés :

Méthodes de référence, Matériaux de Référence Certifiés, Cholestérol, Triglycérides, Evaluation externe de la qualité, Traçabilité métrologique, Laboratoires de biologie médicale, Commutabilité, Spectrométrie de masse.

# Abstract

Reliable measurements in medical biology are essential for early screening and appropriate follow-up of patients. Ensuring metrological traceability of clinical measurements to higher order reference methods or certified reference materials enables to obtain comparable results over time and between different laboratories that could use different methods to quantify the same biomarker.

In this study, reference methods were developed and validated for lipid profile biomarkers (total cholesterol, triglycerides, HDL-C, and LDL-C). Their value added in proficiency testing schemes was demonstrated against consensus mean. They were also used to characterize a certified reference material (CRM) that may be used both as quality control and/or calibrator of field methods. The CRM was shown to be commutable for most field methods and lipid profile biomarkers, which proved it was suitable to assess trueness. Results of our multicenter study showed that field methods tend to underestimate triglycerides (particularly at low concentrations) and overestimate total cholesterol and LDL-C (especially around the clinical threshold), resulting in false positives and significant patient misclassifications. An approach of non-commutability correction was also presented to allow trueness assessment with non-commutable samples. In conclusion, this work highlights the importance of using reference methods and also commutable CRM to rigorously assess accuracy of field methods used in clinical laboratories.

## **Keywords:**

Reference methods, Certified Reference Materials, Cholesterol, Triglycerides, Proficiency testing schemes, Metrological traceability, Clinical Laboratories, Commutability, Mass spectrometry.

# Table des matières

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>15</b>
<b>Partie A - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>19</b>
<b>I. Assurance qualité en biologie médicale.....</b>	<b>21</b>
<b>1. Enjeux relatifs à la fiabilité des analyses médicales .....</b>	<b>21</b>
<b>2. Organisation des contrôles de qualité en France.....</b>	<b>22</b>
2.1. Accréditation des laboratoires de biologie médicale .....	22
2.2. Contrôles internes et contrôles externes de la qualité .....	24
2.2.1. Les contrôles internes de la qualité (CIQ) .....	24
2.2.2. Les évaluations externes de la qualité (EEQ).....	26
2.2.3. Evaluation des incertitudes de mesure.....	27
<b>3. Valeur ajoutée de la métrologie en biologie médicale .....</b>	<b>29</b>
3.1. Traçabilité .....	29
3.2. Méthodes de référence et matériaux de référence certifiés .....	30
3.3. Commutabilité.....	32
3.3.1. Définition de la commutabilité .....	32
3.3.2. Comment évaluer la commutabilité d'un matériau ? .....	33
3.3.3. La correction des effets de matrice .....	35
3.4. Impact économique .....	36
<b>II. Les lipoprotéines.....</b>	<b>37</b>
<b>1. Structure des lipoprotéines.....</b>	<b>37</b>
<b>2. Métabolisme des lipoprotéines .....</b>	<b>39</b>
2.1. Les Chylomicrons .....	41
2.2. La cascade VLDL-IDL-LDL.....	41
2.3. Les HDL.....	42
<b>3. Lipoprotéines et athérosclérose .....</b>	<b>43</b>
3.1. Epidémiologie .....	43
3.1.1. Définition et prévalence des dyslipidémies.....	43
3.1.2. Dyslipidémies et risque cardiovasculaire .....	45
3.1.3. Etudes d'intervention.....	47
3.2. Mécanisme de l'athérosclérose .....	48
3.2.1. Rôle athérogène des lipoprotéines de faible densité .....	49
3.2.2. Rôle protecteur des HDL.....	51
3.3. Traitement et seuils thérapeutiques.....	52
<b>III. Méthodes de dosage pour les biomarqueurs du bilan lipidique .....</b>	<b>53</b>
<b>1. Méthodes de dosage du cholestérol total .....</b>	<b>53</b>
1.1. Méthodes de dosage utilisées par les laboratoires de biologie médicale.....	54
1.1.1. Méthodes utilisant un chromogène phénolique .....	54
1.1.2. Méthodes utilisant un chromogène non phénolique.....	55
1.1.3. Interférences.....	57
1.2. Méthodes de référence .....	58
1.2.1. Méthode de référence par spectrophotométrie.....	58
1.2.2. Méthodes de référence par dilution isotopique .....	60
<b>2. Méthodes de dosage du LDL-cholestérol .....</b>	<b>66</b>
2.1. Méthodes utilisées par les laboratoires de biologie médicale .....	66
2.1.1. Calcul du LDL-cholestérol par l'équation de Friedewald .....	67

2.1.2. Les méthodes dites « directes » .....	68
2.2. Méthode de référence : la $\beta$ -quantification.....	77
<b>3. Méthodes de dosage du HDL-cholestérol .....</b>	<b>79</b>
3.1. Méthodes utilisées par les laboratoires de biologie médicale .....	80
3.1.1. Techniques de précipitation sélective des lipoprotéines .....	80
3.1.2. Méthodes homogènes.....	81
3.2. Méthode de référence.....	84
<b>4. Méthodes de dosage des triglycérides.....</b>	<b>85</b>
4.1. Méthodes de dosage utilisées par les laboratoires de biologie médicale.....	85
4.2. Méthodes de référence .....	86
<b>IV. Conclusion .....</b>	<b>88</b>
<b>Partie B- PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>89</b>
<b>I. Caractérisation et validation des méthodes de référence.....</b>	<b>91</b>
1. Méthode de référence pour le dosage du cholestérol total .....	91
1.1. Protocole analytique .....	91
1.1.1. Préparation des échantillons et des étalons .....	91
1.1.2. Paramètres en GC/MS .....	93
1.2. Evaluation de la justesse et de la fidélité .....	96
1.3. Estimation des incertitudes .....	99
2. Méthode de référence pour le dosage du HDL-C et LDL-C.....	102
2.1. Protocole analytique .....	102
2.2. Evaluation de la justesse et de la fidélité .....	103
2.2.1. HDL-cholestérol .....	103
2.2.2. LDL-cholestérol.....	106
2.3. Estimation des incertitudes .....	108
3. Méthode de référence pour le dosage des triglycérides.....	113
3.1. Protocole analytique .....	113
3.1.1. Préparation des échantillons et des étalons .....	113
3.1.2. Paramètres GC/MS.....	114
3.2. Evaluation de la justesse et de la fidélité .....	117
3.3. Estimation des incertitudes .....	120
<b>II. Intérêt des méthodes de référence dans les évaluations externes de la qualité</b>	<b>123</b>
<b>III. Importance de la commutabilité des matériaux d'étalonnage et de contrôle de qualité.....</b>	<b>133</b>
<b>IV. La correction de non commutabilité : une alternative aux échantillons non commutables .....</b>	<b>171</b>
1. Matériels et Méthodes .....	171
1.1. Correction de non commutabilité en un point.....	172
1.2. Correction de non commutabilité par régression linéaire .....	173
1.3. Correction de non commutabilité par plage de concentrations .....	175
2. Résultats et Discussion .....	175
2.1. Correction de non commutabilité en un point.....	175
2.2. Correction de non commutabilité par régression linéaire .....	176
2.3. Correction de non commutabilité par plage de concentration .....	178
3. Conclusion.....	180
<b>V. Développement d'une nouvelle méthode de référence du LDL-cholestérol .....</b>	<b>181</b>
1. Matériels et Méthodes .....	181

Purification de lipoprotéines à l'aide de microbilles fonctionnalisées .....	181
1.2. Purification de lipoprotéines via la formation de complexes d'anticorps primaires, secondaires et de PEG .....	182
1.3. Purification de lipoprotéines par colonnes d'affinité .....	183
<b>2. Résultats et Discussion .....</b>	<b>184</b>
2.1. Purification de lipoprotéines à l'aide de microbilles fonctionnalisées .....	184
2.2. Purification de lipoprotéines via la formation de complexes d'anticorps primaires, secondaires et de PEG .....	185
2.3. Purification de lipoprotéines par colonnes d'affinité .....	189
<b>3. Conclusion .....</b>	<b>191</b>
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>193</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>201</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>215</b>

# Liste des figures

Figure 1 : Périodicité des audits et cycles d'accréditation COFRAC .....	23
Figure 2 : Traçabilité métrologique. ....	30
Figure 3 : Principe de l'évaluation de la commutabilité.....	34
Figure 4 : Protocole de correction des effets matriciels .....	35
Figure 5 : Composition générale des lipoprotéines. ....	38
Figure 6 : Métabolisme des lipoprotéines. ....	40
Figure 7 : Relation entre la concentration en cholestérol total et la mortalité coronaire.....	45
Figure 8 : Relation entre la concentration en HDL-cholestérol et la mortalité coronaire. ....	46
Figure 9 : Mécanisme de formation des plaques athéromateuses. ....	50
Figure 10 : Réaction enzymatique utilisant un chromogène phénolique.....	55
Figure 11 : Principe de la spectrorélectométrie.....	56
Figure 12 : Réaction de dosage par spectrophotométrie avec un chromogène non phénolique.....	57
Figure 13 : Principe de la dilution isotopique associée à l'ID-GC/MS ou ID-LC/MS.....	60
Figure 14 : Les principales étapes communes aux méthodes de référence .....	61
Figure 15 : Les étalons internes utilisés dans les méthodes de référence du cholestérol.....	62
Figure 16 : La réaction de dérivation du cholestérol.....	64
Figure 17 : Principe de la méthode homogène « SOL ».....	71
Figure 18 : Principe de la méthode homogène « SUR ».....	72
Figure 19 : Principe de la méthode homogène « PRO ».....	74
Figure 20 : Principe de la méthode homogène « CAT ».....	75
Figure 21 : Principe de la $\beta$ -quantification.....	78
Figure 22 : Principe de la méthode utilisant les enzymes modifiées avec du PEG .....	81
Figure 23 : Principe de la méthode utilisant un accélérateur et un détergent spécifique. ....	82
Figure 24 : Principe de la méthode d'immuno-inhibition .....	82
Figure 25 : Principe de la méthode utilisant un mélange de poly-anions et de détergents . ....	83
Figure 26 : Principe de la méthode utilisant une catalase .....	83
Figure 27 : Principe de la méthode enzymatique de dosage des triglycérides .....	85
Figure 28 : Principe des 2 méthodes de référence pour le dosage des triglycérides .....	87
Figure 29 : Chromatogramme d'une solution échantillon contenant le cholestérol marqué. ....	94
Figure 30 : Spectre de masse du cholestérol non-marqué NIST 911c.....	95
Figure 31 : Justesse de la méthode de référence du cholestérol total avec le NIST 1951b L1.....	97
Figure 32 : Justesse de la méthode de référence du cholestérol total avec le NIST 1951b L2.....	98
Figure 33 : Budget d'incertitude obtenu pour le cholestérol total.....	100
Figure 34 : Protocole de la $\beta$ -quantification.....	103
Figure 35 : Justesse de la méthode de référence du HDL-cholestérol avec le MRC LNE L1 .....	104
Figure 36 : Justesse de la méthode de référence du HDL-cholestérol avec le MRC LNE L2 .....	105
Figure 37 : Justesse de la méthode de référence du LDL-cholestérol avec le MRC LNE L1.....	106
Figure 38 : Justesse de la méthode de référence du LDL-cholestérol avec le MRC LNE L2.....	107
Figure 39 : Budget d'incertitude pour la mesure du LDL-cholestérol par $\beta$ -quantification.....	109
Figure 40 : Budget d'incertitude pour le dosage du cholestérol après ultracentrifugation. ....	110
Figure 41 : Budget d'incertitude pour la mesure du HDL-cholestérol .....	111
Figure 42 : Chromatogramme d'une solution échantillon (NIST 909c). ....	115
Figure 43 : Spectre de masse d'une solution échantillon après ajout de la molécule marquée. ...	116
Figure 44 : Justesse de la méthode de référence des triglycérides avec le NIST 909c.....	118
Figure 45 : Justesse de la méthode de référence des triglycérides avec le MRC LNE L2.....	119
Figure 46 : Budget d'incertitude obtenu pour les triglycérides. ....	120
Figure 47 : Evaluation de la commutabilité des échantillons B9 et B10.....	171
Figure 48 : Détermination de l'effet de matrice par l'utilisation d'une régression linéaire.....	174
Figure 49 : Principe de la précipitation des complexes composés d'anticorps et de PEG. ....	182
Figure 50 : Principe de l'immuno-affinité sur colonne de protéine A.....	183
Figure 51 : Essais réalisés avec différentes combinaisons de billes fonctionnalisées. ....	184
Figure 52 : Effet d'une quantité croissante de PEG sur les HDL et LDL.....	186
Figure 53 : Western Blot réalisé avec des quantités décroissantes d'apoA-I .....	187
Figure 54 : Western Blot réalisé avec des quantités croissantes d'anticorps II <sup>aires</sup> .....	188
Figure 55 : Western Blot réalisé sur les fractions après colonne de protéine A. ....	190



## Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques physiques et chimiques des lipoprotéines.....	39
Tableau 2 : Principales causes de décès dans le monde.....	43
Tableau 3 : Analyses médicales les plus réalisées et les plus chères à la sécurité sociale.....	44
Tableau 4 : Données d'études d'intervention réalisées sur les statines. ....	48
Tableau 5 : Valeurs seuil de LDL-cholestérol nécessitant une intervention médicamenteuse. ....	52
Tableau 6 : Facteurs de risque et facteur protecteur de l'athérosclérose.....	52
Tableau 7 : Méthodes de référence pour le dosage du cholestérol total. ....	59
Tableau 8 : Comparaison des conditions d'hydrolyse. ....	63
Tableau 9 : Comparaison des conditions de dérivation.....	65
Tableau 10 : Tableau récapitulatif des méthodes directes homogènes les plus utilisées. ....	76
Tableau 11 : Méthode de référence pour le LDL-cholestérol répertoriée par le JCTLM .....	77
Tableau 12 : Critères de fidélité intermédiaire et de justesse pour les méthodes de référence .....	91
Tableau 13 : Volumes de sérum à prélever en fonction de la concentration en cholestérol .....	92
Tableau 14 : Volumes respectifs des solutions mères de cholestérol et de cholestérol marqué.....	92
Tableau 15 : Conditions chromatographiques utilisées pour l'analyse du cholestérol .....	94
Tableau 16 : Conditions en spectrométrie de masse utilisées pour l'analyse du cholestérol. ....	95
Tableau 17 : Volumes respectifs des solutions mères de NIST 1951b et de trioléine marqué.....	113
Tableau 18 : Conditions chromatographiques utilisées pour l'analyse des triglycérides.....	115
Tableau 19 : Conditions en spectrométrie de masse utilisées pour l'analyse des triglycérides. ...	116
Tableau 20 : Correction de non commutabilité à l'aide d'un échantillon natif de sérum humain ...	175
Tableau 21 : Résultats de correction de non commutabilité par régression linéaire .....	177
Tableau 22 : Approche par plage de concentration .....	179
Tableau 23 : Conditions expérimentales des premiers essais d'immuno-précipitation .....	187
Tableau 24 : Détermination de la quantité optimale d'anticorps II <sup>aires</sup> .....	188
Tableau 25 : Conditions des premiers essais sur colonne de protéine A. ....	189
Tableau 26 : Récapitulatif des expressions mathématiques des incertitudes.....	218

## Liste des Annexes

Annexe 1 : Evaluation des incertitudes selon la méthode du GUM.....	217
Annexe 2 : Produits et équipements.....	221
Annexe 3 : Méthode de quantification.....	222
Annexe 4 : Budget d'incertitude du cholestérol total .....	225

## Abréviations

<b>ANSM</b>	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
<b>apo</b>	Apolipoprotéine
<b>Asqualab</b>	Assurance qualité des laboratoires d'analyse de biologie médicale
<b>AVC</b>	Accident Vasculaire Cérébral
<b>BSA</b>	bis(TMS)acétamide
<b>BSTFA</b>	N,O-bis(TMS)trifluoroacétamide
<b>CCQM</b>	Comité Consultatif pour la Qualité de Matière
<b>CDC</b>	<i>Center for Disease Control and prevention</i>
<b>CETP</b>	<i>Cholesterylester Transfer Protein</i>
<b>CHE</b>	Cholestérol Estérase
<b>CIQ</b>	Contrôle Interne de la Qualité
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>CM</b>	Chylomicrons
<b>CNQ</b>	Contrôle National de Qualité
<b>CO</b>	Cholestérol Oxydase
<b>COFRAC</b>	Comité Français d'Accréditation
<b>CT</b>	Cholestérol Total
<b>CTCB</b>	Centre Toulousain pour le Contrôle qualité en Biologie clinique
<b>CV</b>	Coefficient de Variation
<b>DGKC</b>	<i>Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie</i>
<b>DIV</b>	Diagnostic <i>in vitro</i>
<b>DSBmT</b>	Disodium de N,N-bis-(4-sulfobutyl)- <i>m</i> -toluidine
<b>EAL</b>	Exploration d'une Anomalie Lipidique
<b>EEQ</b>	Evaluation Externe de la Qualité
<b>FPLC</b>	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
<b>GBEA</b>	Guide de Bonne Exécution des Analyses
<b>GC/MS</b>	Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
<b>GLS</b>	<i>Generalized Least Square</i>
<b>GUM</b>	<i>Guide to the expression of Uncertainty in Measurement</i>
<b>HDL</b>	<i>High-Density Lipoprotein</i>
<b>HL</b>	<i>Hepatic Lipase</i>
<b>HLB</b>	<i>Hydrophile-Lipophile Balance</i>
<b>HLP</b>	Hyperlipoprotéïnémie
<b>HPST</b>	"Hôpitaux, Patients, Santé et Territoire"
<b>ICAM-1</b>	<i>Intracellular Adhesion Molecule-1</i>
<b>ID</b>	<i>Isotope Dilution</i>
<b>IDL</b>	<i>Intermediate-Density Lipoprotein</i>
<b>IDM</b>	Infarctus Du Myocarde
<b>IFCC</b>	<i>International Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine</i>
<b>IRMM</b>	<i>Institute for Reference Materials and Measurements</i>
<b>ISO</b>	<i>International Organization of Standardization</i>
<b>JCTLM</b>	<i>Joint Commitee for Traceability in Laboratory Medicine</i>

<b>K4</b>	Kringle 4
<b>LBM</b>	Laboratoire de Biologie Médicale
<b>LCAT</b>	<i>Lecithin/Cholesterol AcylTransferase</i>
<b>LDL</b>	<i>Low-Density Lipoprotein</i>
<b>Lp(a)</b>	Lipoprotéine (a)
<b>LPL</b>	Lipoprotéine Lipase
<b>LRP</b>	<i>LDL Receptor-related Protein</i>
<b>MR</b>	Matériau de référence
<b>MRC</b>	Matériau de Référence Certifié
<b>MSTFA</b>	N-(TMS)-N-methyltrifluoroacétamide
<b>MTP</b>	<i>Microsomal triglyceride Transfer Protein</i>
<b>NCEP</b>	<i>National Cholesterol Education Program</i>
<b>NIH</b>	<i>National Institute of Health</i>
<b>NIST</b>	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>PAF-AH</b>	<i>Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase</i>
<b>PEG</b>	Polyéthylène Glycol
<b>PIB</b>	Produit Intérieur Brut
<b>PL</b>	phospholipides
<b>PLTP</b>	<i>Phospholipid Transfer Protein</i>
<b>POD</b>	Peroxydase
<b>POE-POP</b>	Polyoxyéthylène-polyoxypropylène
<b>PON1</b>	Paraoxanase1
<b>Pro Bio Qual</b>	Association pour la promotion du contrôle de qualité en biologie
<b>SFBC</b>	Société Française de Biologie Clinique
<b>SI</b>	Système International
<b>SIM</b>	<i>Single Ion Monitoring</i>
<b>SRM</b>	<i>Standard Reference Material</i>
<b>TG</b>	Triglycérides
<b>TMS</b>	Trimethylsilyl
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i>
<b>VCAM-1</b>	<i>Vascular Adhesion Molecule-1</i>
<b>VIM</b>	Vocabulaire International de la Métrologie
<b>VLDL</b>	<i>Very-Low-Density Lipoprotein</i>

## ***INTRODUCTION***



A l'heure actuelle, les maladies cardiovasculaires représentent la principale cause de mortalité dans le monde et en particulier dans les pays développés. Les cardiopathies ischémiques ainsi que les accidents vasculaires cérébraux entraînent plus de 13 millions de décès chaque année et représentent un problème majeur de santé publique. Il est actuellement bien établi que les dyslipidémies, c'est-à-dire les anomalies biologiques lipidiques, représentent un des paramètres majeurs du risque cardiovasculaire. Plus particulièrement, le risque cardiovasculaire est corrélé positivement à la concentration sérique de cholestérol total ou de LDL-cholestérol, et négativement à la concentration sérique de HDL-cholestérol. L'augmentation de la triglycéridémie est également associée à une majoration des événements cardiovasculaires.

En France, ces dyslipidémies sont essentiellement dépistées et suivies par la réalisation de l'Exploration d'une Anomalie Lipidique (EAL). Cet examen biologique correspond à la mesure du cholestérol total, des triglycérides ainsi que du HDL-cholestérol et du LDL-cholestérol présents dans le sérum. La prise de décision médicale visant à instaurer ou non un traitement médicamenteux s'appuie sur les résultats de cet examen. Il est donc primordial de disposer de mesures fiables (traçables et justes) de ces différents analytes afin de permettre un dépistage et un suivi adapté des patients.

Dans cette optique, différentes normes et directives ont pour vocation d'améliorer la fiabilité des analyses médicales. En France, il existe un contexte réglementaire où la réforme de la biologie rend obligatoire l'accréditation selon le référentiel NF EN ISO 15189 « Laboratoires de biologie médicale - Exigences concernant la qualité » pour tous les examens réalisés par les laboratoires de biologie d'ici quelques années. Cette norme comporte les exigences relatives au management de la qualité et les compétences requises pour les laboratoires de biologie médicale (LBM) afin de fournir des résultats de mesure traçables et fiables. Elle implique entre autre la mise en place de contrôles de la qualité permettant d'évaluer et de suivre les performances des méthodes de dosage utilisées en routine, notamment la fidélité intermédiaire, la justesse et l'exactitude. Ce référentiel impose également au laboratoire l'utilisation de procédures validées, dont les résultats doivent être raccordés à un étalon national ou international par le biais d'une chaîne de traçabilité métrologique ininterrompue. Actuellement, il apparaît que contrairement aux autres domaines de mesure, les résultats des analyses de biologie médicale ne sont pas toujours traçables à des références reconnues internationalement (comme par exemple des matériaux de référence certifiés ou des méthodes de référence) et que les incertitudes de mesure ne sont pas systématiquement évaluées. Cette situation est en contradiction non seulement avec la norme NF EN ISO 15189, mais aussi avec d'autres référentiels internationaux qui exigent que les valeurs associées aux matériaux d'étalonnage et de contrôle de la qualité soient traçables aux étalons de mesure d'ordre métrologique supérieur comme la directive 98/79/CE de l'Union Européenne relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*.

Hélas, il existe actuellement un manque important en matière de méthodes de référence et de matériaux de référence certifiés. Dans la perspective de la réforme de la biologie médicale et pour donner aux professionnels du diagnostic les moyens de répondre aux exigences de l'accréditation, ce travail de thèse propose de développer des méthodes de référence primaires pour le dosage des biomarqueurs mesurés lors de l'évaluation d'une anomalie lipidique. Ces méthodes serviront à caractériser un matériau de référence certifié qui pourra être utilisé afin de valider les méthodes développées par les fabricants de produits de diagnostic *in vitro* et pour le contrôle qualité des méthodes de routine. Ces méthodes de référence pourront également être utilisées afin de fournir des valeurs de référence lors d'Evaluations Externes de la Qualité (EEQ). En effet, la valeur de référence sera privilégiée par rapport à la valeur consensuelle actuellement utilisée, et qui correspond à la moyenne des valeurs obtenues par tous les participants ou au sein du même groupe de pairs.

Ce manuscrit est divisé en 2 grandes parties. La première partie est consacrée à l'étude bibliographique. Elle comprend un état de l'art de l'assurance qualité en biologie clinique et de l'athérosclérose, l'une des principales causes des maladies cardiovasculaires, ainsi que du rôle des lipoprotéines impliquées dans cette pathologie. Les différentes méthodes actuellement utilisées afin de doser les lipides associés à ces lipoprotéines, soit le cholestérol total, le LDL-cholestérol, le HDL-cholestérol et les triglycérides, sont également décrites.

La deuxième partie sur le « travail expérimental » est divisée en 5 Chapitres. Le Chapitre I porte sur la caractérisation et la validation des méthodes de référence pour le dosage du cholestérol total, du LDL-cholestérol, du HDL-cholestérol et des triglycérides. Le Chapitre II est consacré au rôle des méthodes de référence dans l'évaluation de la fiabilité des méthodes de routine à travers des EEQ. Dans le Chapitre III est évaluée l'importance de disposer de matériaux d'étalonnage et de contrôle de la qualité commutables grâce à l'organisation d'une étude de commutabilité. Le Chapitre IV présente les différentes approches de correction de non commutabilité pouvant être appliquées à un échantillon de contrôle non commutable. Pour finir, le dernier chapitre expose les premiers essais réalisés avec une approche immunologique afin de développer une méthode de référence directe et spécifique pour le dosage du LDL-cholestérol.

## ***Partie A - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE***





# **I. Assurance qualité en biologie médicale**

## **1. Enjeux relatifs à la fiabilité des analyses médicales**

En biologie médicale, il est important de disposer de mesures fiables du fait de leur importance croissante dans la prise en charge des patients. Dans le rapport « *The value of diagnostics : Innovation, adoption and diffusion into health care* » publié en 2005, le Lewin group souligne que 60 à 70 % des prises de décision s'appuient sur les résultats de tests de diagnostic *in vitro* [1]. Le manque de fiabilité des analyses médicales peut conduire à leur répétition ainsi qu'à une prise en charge inappropriée des patients. En matière de santé publique, un diagnostic erroné peut entraîner des traitements inutiles, augmentant ainsi le risque de développer des maladies iatrogènes. Inversement, des patients nécessitant un traitement ne seront pas diagnostiqués et leur état sera susceptible de s'aggraver. Le Washington Post et le Medical Laboratory Observer ont rapporté que 25 à 30 % des mesures liées à la santé étaient effectuées pour des raisons autres que le diagnostic (répétition d'examens, prévention et détection des erreurs) et estime que 10 à 30 milliards de dollars pourraient être économisés chaque année en améliorant la fiabilité des mesures. En Allemagne, le coût de la répétition des mesures est estimé à environ 1,5 milliards d'euros par an [2].

A ces différentes données s'ajoute la situation inquiétante dans laquelle se trouve la Sécurité Sociale en France. En effet, le déficit du régime général de la Sécurité Sociale ne cesse de s'aggraver et a atteint 13,3 milliards d'euros en 2012 [3]. Cette aggravation s'explique en partie par la constante augmentation depuis de nombreuses années des dépenses liées aux actes de biologie médicale. Entre 2000 et 2011, ces dépenses ont vu leur coût augmenter de 2,63 à 4,37 milliards d'euros facturés à l'ensemble des régimes d'assurance maladie [4]. Selon une note publiée par cet organisme en juillet 2007, « *si l'on projette les dépenses d'assurance maladie à l'horizon 2015, sur la base des tendances observées sur la période 1998-2004, on estime qu'elles devraient atteindre 210 milliards d'euros contre 140 milliards actuellement soit une hausse de 50 %.* [...] *L'analyse des principales dynamiques du système de santé permet d'identifier trois axes prioritaires pour faire évoluer notre système et répondre à ces enjeux clés : prévenir l'aggravation des pathologies chroniques, accroître l'efficacité du système de soin et organiser le mode de recours aux soins en fonction des besoins des assurés.* » L'amélioration de la qualité des analyses médicales s'inscrit donc pleinement dans ce contexte de rationalisation des dépenses de santé.

Il est donc nécessaire d'évaluer et d'améliorer la qualité des analyses pratiquées dans les laboratoires de biologie médicale (LBM), grâce entre autres, à la réalisation de contrôles de la qualité dont le principe est décrit dans les paragraphes qui suivent.

## 2. Organisation des contrôles de qualité en France

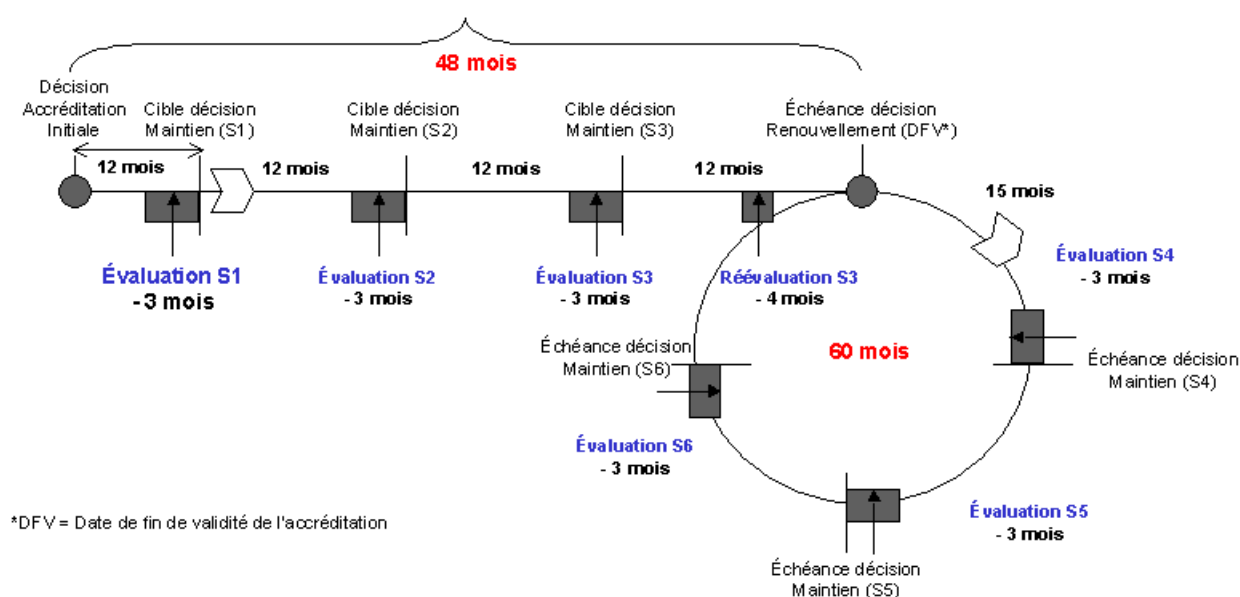
### 2.1. Accréditation des laboratoires de biologie médicale

Dans le cadre de la réforme de la biologie prévue par la loi « Hôpitaux, Patients, Santé et Territoire », l'accréditation de tous les laboratoires selon le référentiel NF EN ISO 15189 : « Laboratoires d'analyse de biologie médicale - Exigences particulières concernant la qualité et la compétence », va devenir obligatoire d'ici 2016 et il est demandé aux laboratoires de suivre un calendrier très précis. En effet, les laboratoires de biologie médicale ont pour date butoir le 31 octobre 2013, date avant laquelle ils doivent apporter la preuve de leur entrée effective dans une démarche d'accréditation. Ils auront ensuite jusqu'au 31 octobre 2016 pour obtenir leur accréditation sur au moins 50% des analyses d'une même famille. Ils seront ensuite évalués par le COFRAC et devront participer à des opérations d'évaluation externe de la qualité pour toutes les analyses réalisées. Si les laboratoires n'obtiennent pas leur accréditation ou bien s'ils la perdent, ils ne seront plus autorisés à exercer leur activité. L'article L.6221-1 issu de l'ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale stipule qu'un « *laboratoire de biologie médicale ne peut réaliser d'examen de biologie médicale sans accréditation* » [5]. Cela aura pour conséquence de profondément modifier les pratiques en matière de contrôle de la qualité et de remplacer le « Guide de Bonne Exécution des Analyses de biologie Médicale » (ou GBEA) [6], qui constituait jusqu'à présent le référentiel auquel devaient se conformer les laboratoires de biologie médicale.

L'accréditation permet une reconnaissance de la compétence d'un laboratoire de biologie médicale. Son objectif est de garantir la fiabilité des examens de biologie médicale et la qualité de la prestation offerte par le laboratoire mais aussi de garantir la fiabilité des techniques qui relèvent de la biologie médicale [7]. En France, seul le COFRAC (comité français d'accréditation) est habilité à accréditer les laboratoires de biologie médicale. Afin de les aider dans leur démarche d'accréditation, ce comité met à disposition différents guides techniques explicitant les exigences des référentiels d'accréditation. On peut entre autres citer le « guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale [8] » (« SH GTA 04 ») ainsi que le « guide technique d'accréditation : contrôles de qualité en biologie médicale [9] » (« SH GTA 06 »).

La procédure d'accréditation commence lorsque le COFRAC accuse réception d'une demande écrite adressée par le laboratoire de biologie médicale [10]. Après soumission et acceptation du dossier, un « examen de recevabilité opérationnelle » est réalisé afin de s'assurer que les dispositions prises par le laboratoire sont conformes aux différentes exigences du référentiel d'accréditation. Si cet examen ne révèle pas de lacune du laboratoire, « l'évaluation initiale sur

site » peut avoir lieu. A l'issue de l'évaluation, les non-conformités sont relevées et le laboratoire doit proposer une action corrective aux différents écarts. Le rapport d'évaluation fait ensuite l'objet d'un pré-examen par la structure permanente avant d'être confié pour avis à une commission. La décision d'accréditation est prise par le Directeur général du COFRAC ou son délégataire sur la base de l'avis proposé par la commission consultée. Elle est ensuite transmise au laboratoire. L'accréditation est délivrée au laboratoire pour une période maximale de 4 ans renouvelable. Durant cette période, le laboratoire est soumis à des évaluations sur site périodiques tous les 12 mois ou plus. Au bout de ces 4 ans, l'accréditation peut être renouvelée par période de 5 ans durant laquelle les évaluations périodiques ont lieu tous les 15 mois (Figure 1).



**Figure 1 : Périodicité des audits et cycles d'accréditation COFRAC, LAB REF 05 [11].**

*Accréditation accordée pour une période de 48 mois puis renouvelée par cycle de 60 mois. Les audits ont lieu tous les 12 mois ou 15 mois pour un renouvellement.*

Actuellement, l'accréditation est délivrée par champ d'activité (biochimie, hématologie, etc...) et non pas pour l'ensemble des activités d'un laboratoire. C'est le biologiste qui choisit les analyses à accréditer ainsi que la description des activités pour lesquelles le laboratoire est accrédité (champ ou domaine, produit ou matrice, grandeur ou caractéristique, méthode, technique d'essai ou de mesure).

La norme NF EN ISO 15189 est une norme spécifique qui couvre la totalité de l'activité des laboratoires de biologie médicale. Son adoption a pour but d'aider les pays à utiliser une approche uniforme afin d'établir la compétence des laboratoires de biologie médicale et d'encourager ces derniers à adopter des pratiques internationalement reconnues. Elle conjugue les exigences du

système qualité des normes NF EN ISO 9001 [12] et NF EN ISO 17025 [9] ainsi que les exigences techniques propres aux analyses de biologie médicale. Les parties traitant des « *Exigences techniques* » sont quant à elles inspirées de celles présentes dans la norme NF EN ISO 17025.

Une exigence importante de la norme NF EN ISO 15189 concerne la mise en place de contrôles de la qualité au sein du laboratoire afin de déceler les anomalies et erreurs de mesure. Cette exigence est exposée dans le paragraphe 5.6 « Assurer la qualité des procédures analytiques » et impose aux laboratoires de participer à des contrôles internes et externes de la qualité. En effet, cette norme indique dans le paragraphe 5.6.1. que « *Le laboratoire doit concevoir des systèmes de contrôle interne de qualité permettant de vérifier que la qualité prévue des résultats est bien obtenue* ». De plus, dans le paragraphe 5.6.4. concernant les contrôles externes de la qualité, il est également explicité que « *Le laboratoire doit participer à des comparaisons interlaboratoires, telles que celles organisées dans le cadre de programmes d'évaluation externe de la qualité* » [10].

## **2.2. Contrôles internes et contrôles externes de la qualité**

Les contrôles de la qualité sont des outils d'amélioration de la qualité dont le but est d'évaluer les laboratoires de biologie médicale en vérifiant de façon continue leurs performances. Il existe en France deux types de contrôles de la qualité complémentaires : les contrôles internes de la qualité (CIQ) effectués par les laboratoires eux-mêmes, et les évaluations externes de la qualité (EEQ) réalisées par des organismes extérieurs et dont certaines sont obligatoires.

### **2.2.1. Les contrôles internes de la qualité (CIQ)**

Afin d'aider les laboratoires dans cette démarche, des guides de bonnes pratiques ainsi que des normes réglementent la mise en place de « l'assurance qualité » [13]. Actuellement, les laboratoires de biologie médicale (LBM) doivent se conformer aux règles et recommandations contenues dans le GBEA [6]. Ce dernier impose la réalisation de contrôles internes de la qualité qui ont pour objectif de permettre de déceler les anomalies et les erreurs de mesure afin d'y remédier de façon immédiate.

Concrètement, le contrôle interne de la qualité (CIQ) comporte trois objectifs. Le premier est de contrôler l'étalonnage. Le deuxième objectif des CIQ est un contrôle continu des critères de performance qui sont la répétabilité, la fidélité intermédiaire et, dans certaines conditions, la

justesse et l'exactitude de la méthode utilisée. Les CIQ permettent également de vérifier les performances des réactifs utilisés.

Concernant la répétabilité, l'analyse répétée d'un même échantillon dans les mêmes conditions (même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage) va permettre de caractériser la performance d'un appareil et la vérifier pour un analyte donné. Il est recommandé d'utiliser au minimum deux échantillons de deux niveaux de concentration différents, dont un est le plus proche possible du seuil décisionnel. Le coefficient de variation (CV) est alors calculé à partir de la moyenne et l'écart-type obtenus avec les résultats expérimentaux puis comparé à celui fourni par exemple par le fabricant de diagnostic *in vitro*.

La fidélité intermédiaire, contrairement à la répétabilité, correspond à l'analyse répétée d'un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs suivants : l'opérateur, le jour, le lot de réactifs, l'étalonnage. Il est nécessaire de l'évaluer sur au minimum 15 jours avec 30 déterminations à partir de deux niveaux différents de concentration. Tout comme pour la répétabilité, le coefficient de variation calculé est comparé à la limite de CV acceptable fourni par exemple par le fabricant de diagnostic *in vitro* (DIV) ou bien par la Société Française de Biologie Clinique (SFBC) [14] ou le NCEP lorsque les valeurs acceptables sont standardisées. Cette analyse permet également d'identifier une éventuelle dérive de l'appareil au cours du temps. Les échantillons utilisés afin de déterminer la répétabilité et la reproductibilité des résultats d'une méthode peuvent être commerciaux ou préparés par le laboratoire à partir de leurs propres échantillons.

Pour évaluer la justesse d'une méthode, il est souhaitable de disposer de « valeurs vraies » fournies par des matériaux de référence certifiés (MRC) ou grâce à l'assignation de valeurs de référence lors d'évaluations externes de la qualité. Or en biologie médicale, très peu de MRC sont actuellement disponibles. Par défaut, la valeur cible utilisée correspond donc dans la majorité des cas à la valeur du CIQ fournie par le fabricant ou estimée par l'utilisateur au cours d'une période probatoire. L'exactitude, quantifiée par le biais, est alors calculée en comparant la moyenne obtenue lors de l'étude de fidélité intermédiaire à la valeur cible attendue de l'échantillon testé. La justesse se différencie de l'exactitude par le fait qu'il s'agisse de la mesure d'un échantillon stable de valeur connue [15]. En pratique, cette dernière est évaluée le plus souvent par les laboratoires de biologie médicale à partir d'étalons de fabricants ou des données des EEQ.

Le troisième et dernier objectif des CIQ est de confronter ces résultats à ceux obtenus par d'autres laboratoires du même groupe de pairs, sur un même lot d'échantillons de CIQ, par l'établissement des moyennes permettant d'estimer la justesse. Il s'agit alors de contrôles internes de la qualité externalisés.

### 2.2.2. Les évaluations externes de la qualité (EEQ)

Les évaluations externes de la qualité sont préconisées par le GBEA, et sont définies comme correspondant « *au contrôle, par un organisme extérieur, de la qualité des résultats fournis par un laboratoire. Ce contrôle rétrospectif permet une confrontation inter-laboratoire en vue d'améliorer la qualité du travail de l'ensemble des participants* » [6]. En effet, le GBEA rappelle qu'il est obligatoire à tous les laboratoires de biologie médicale de se soumettre au « Contrôle de Qualité National » (CNQ) et recommande une participation régulière aux contrôles volontaires. La norme NF EN ISO 15189 reprend ces exigences et indique que « *Le laboratoire doit participer à des comparaisons interlaboratoires, telles que celles organisées dans le cadre de programmes d'évaluation externe de la qualité. La direction du laboratoire doit surveiller les résultats de l'évaluation externe de la qualité et participer à la mise en œuvre des actions correctives lorsque les critères de maîtrise ne sont pas respectés* ». Pour ce faire, l'organisme extérieur réalisant l'évaluation adresse le même échantillon biologique de contrôle, dont le résultat est inconnu, aux différents laboratoires participants. Les résultats obtenus sont ensuite collectés et la justesse des méthodes est évaluée par comparaison avec une valeur cible qui correspond la plupart du temps à la moyenne des résultats obtenus par tous les laboratoires ou par groupe de pairs. Dans certains cas, il peut s'agir d'une valeur déterminée à l'aide d'une méthode de référence. Les résultats sont ensuite transmis aux laboratoires accompagnés de commentaires visant à améliorer leurs performances si cela est nécessaire.

Le Contrôle National de Qualité (CNQ) est réalisé une à deux fois par an par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM). La participation des laboratoires est obligatoire et tout refus ou insuffisance de participation est susceptible d'entraîner des sanctions pénales.

Le CNQ a pour but d'analyser les résultats obtenus dans les laboratoires de biologie médicale au niveau national afin d'évaluer la qualité des mesures réalisées. Après avoir traité de façon statistique l'ensemble des résultats par groupe de pairs, l'ANSM renvoie une interprétation aux différents laboratoires. Ces résultats comprennent : le nombre de laboratoires présents dans chaque groupe de pairs, le coefficient de variation inter-laboratoire après une double troncature à deux écart-types, la valeur cible et l'effectif tronqué obtenus après une double troncature afin d'éliminer les valeurs aberrantes pour chaque groupe de pairs, ainsi qu'une conclusion. Les limites acceptables sont aussi définies par rapport à la moyenne générale des résultats obtenus par tous les laboratoires. Au vu des résultats obtenus, une appréciation est ensuite donnée et peut conduire à une action corrective si les résultats sont significativement différents de la valeur cible.

Parallèlement, les laboratoires de biologie médicale ont la possibilité de participer volontairement à des contrôles externes de la qualité organisés par des organismes agréés. Ces EEQ représentent

un outil supplémentaire permettant d'évaluer leur compétence par rapport à leur groupe de pairs en complément des contrôles nationaux de qualité de l'ANSM. De plus, cette démarche d'amélioration de la qualité est continue car plus régulière que celle de l'ANSM (par exemple, tous les mois).

En France, il existe différents organismes dont l'objectif est de promouvoir et de coordonner des programmes de contrôles externes de qualité volontaires. On peut citer entre autres le CTCB (Centre toulousain pour le contrôle qualité en biologie clinique), Pro Bio Qual (Association pour la promotion du contrôle de qualité en biologie), l'association Asqualab (Assurance qualité des laboratoires d'analyses de biologie médicale) et l'association Biologie Prospective. Certains industriels du diagnostic *in vitro* comme par exemple Biorad organisent aussi des contrôles externes de qualité.

### 2.2.3. Evaluation des incertitudes de mesure

Les données obtenues par les contrôles internes et externes de la qualité, telles que le biais et la fidélité intermédiaire, peuvent être utilisées afin d'estimer les incertitudes de mesure des résultats des méthodes quantitatives. En effet, l'estimation des incertitudes est une exigence de la norme NF EN ISO 15189 qui impose au laboratoire de « *déterminer l'incertitude des résultats, dans le cas où cela est pertinent et possible. Toutes les composantes importantes de l'incertitude doivent être prises en compte. Les sources contribuant à l'incertitude peuvent inclure l'échantillonnage, la préparation des échantillons, la sélection des aliquotes d'échantillon, les calibrateurs, les matériaux de référence, les grandeurs d'entrée, l'équipement utilisé, les conditions expérimentales, l'état de l'échantillon et les changements de manipulateurs* ». Afin de répondre à cette exigence, différentes approches pour la détermination des incertitudes de mesure plus ou moins complètes et difficiles à mettre en œuvre peuvent être mises en œuvre. Quatre d'entre elles sont décrites dans le « Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale » du COFRAC et sont résumées ci-après [16].

Dans tous les cas, l'incertitude-type obtenue par le biais de ces différentes méthodes est ensuite multipliée par un facteur d'élargissement  $k$  afin de déterminer l'incertitude élargie. Ce facteur est généralement égal à 2, ce qui correspond à un intervalle de confiance de 95% si la loi de distribution est normale.

#### ➤ La méthode « GUM »

Cette approche est la plus complète et repose sur la méthode de référence de l'évaluation des incertitudes reconnue internationalement et décrite dans le Chapitre 8 du référentiel « Évaluation des données de mesure — Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure » [17]. Son principe, détaillé en Annexe 1, est basé sur l'identification, la modélisation mathématique et la quantification



de toutes les composantes d'incertitude. Dans ce cas, une équation mathématique est établie à partir de l'ensemble des données d'entrée utilisées afin de calculer le résultat de mesure. L'incertitude-type associée au résultat est ensuite évaluée en appliquant la loi de propagation des incertitudes sur chacune de ces grandeurs d'entrée. Cependant, du fait de la difficulté de modélisation du processus, cette démarche est relativement peu utilisée en biologie médicale.

➤ La méthode « Intra-laboratoire (CIQ+Matériaux de Référence) »

Cette méthode repose sur l'exploitation des résultats disponibles au sein du laboratoire (fidélité intermédiaire, justesse, courbe d'étalonnage, etc...) et évalués lors de la vérification/validation de la méthode d'analyse grâce à l'utilisation d'un MRC. Les données de CIQ donnent ainsi accès à la fidélité intermédiaire et le MRC à la justesse. Dans ce cas, le modèle tient compte de l'ensemble des facteurs ayant une influence significative sur le résultat final.

L'incertitude-type sur le résultat d'analyse ( $u(C)$ ) est évaluée en calculant la racine carrée de la somme quadratique de toutes les composantes majoritaires selon la formule suivante :

$$u(C) = \sqrt{u_{justesse}^2 + u_{etalonnage}^2 + u_{etalon}^2 + \sigma_{fidélité\_intermédiaire}^2}$$

La principale limitation de cette méthode est due à la disponibilité des informations prises en compte dans le modèle mathématique. En effet, les laboratoires n'ont pas toujours accès au modèle d'étalonnage utilisé par le fabricant de diagnostic *in vitro* et l'étalon utilisé n'est pas obligatoirement fourni avec un certificat mentionnant les incertitudes associées à la valeur. De plus, concernant l'évaluation de la justesse, très peu de MRC sont actuellement disponibles et leur prix est souvent très élevé. La justesse est donc souvent estimée par d'autres moyens.

➤ La méthode « CIQ/EEQ »

Cette approche est basée sur l'exploitation des données de contrôles internes et externes de la qualité. L'incertitude-type sur le résultat d'analyse est calculée en prenant la racine carrée de la somme quadratique des composantes de l'incertitude issues du CIQ et de l'EEQ selon la formule suivante :

$$u(C) = \sqrt{u_{CIQ}^2 + u_{EEQ}^2}$$

Avec :

- $u_{CIQ}$  = incertitude-type associée à la fidélité intermédiaire (déterminée à partir des résultats du CIQ)
- $u_{EEQ}$  = incertitude-type associée à la justesse (obtenue lors de la participation à des EEQ)

Lorsqu'il n'existe pas d'EEQ satisfaisante ou lorsque l'EEQ n'est pas exploitable, une alternative est d'évaluer la justesse grâce aux CIQ externalisés. Dans ce cas, l'incertitude-type est déterminée suivant la formule :

$$u(C) = \sqrt{u_{CIQ}^2 + u_{CIQ\_externalisé}^2}$$

Avec cette méthode, l'incertitude associée à la justesse sera directement impactée par l'évaluation de la justesse lors des EEQ (ou des CIQ externalisés). Elle dépendra notamment de la valeur cible utilisée pour déterminer le biais, c'est-à-dire la moyenne toutes méthodes confondues, la moyenne par groupe de pairs ou la valeur déterminée par une méthode de référence.

➤ La méthode « CIQ + Etalon fournisseur »

Cette méthode permet de calculer l'incertitude-type sur le résultat en prenant la racine carrée de la somme quadratique des composantes de l'incertitude relatives aux résultats du CIQ ainsi que de l'incertitude de l'étalon fournisseur (donnée fournisseur).

$$u(C) = \sqrt{u_{CIQ}^2 + u_{étalon\_fournisseur}^2}$$

Dans ce cas, l'évaluation des incertitudes associées à la justesse n'est pas faite par rapport à une référence externe. De plus, il est nécessaire que l'étalon fournisseur soit raccordé à un étalon national ou international.

### **3. Valeur ajoutée de la métrologie en biologie médicale**

#### **3.1. Traçabilité**

Une des exigences communes aux normes NF EN ISO 15189 et NF EN ISO 17511 : « Mesurage des grandeurs dans des échantillons d'origine biologique – Traçabilité métrologique des valeurs attribuées aux agents d'étalonnage et aux matériaux de contrôle » [18] concerne la traçabilité des résultats. La directive européenne 98/79/EC [19] impose également cette traçabilité, définie comme étant « *la propriété d'un résultat de mesure selon laquelle ce résultat peut être relié à une référence par l'intermédiaire d'une chaîne ininterrompue et documentée d'étalonnages dont chacun contribue à l'incertitude de mesure* » [15] (Figure 2).

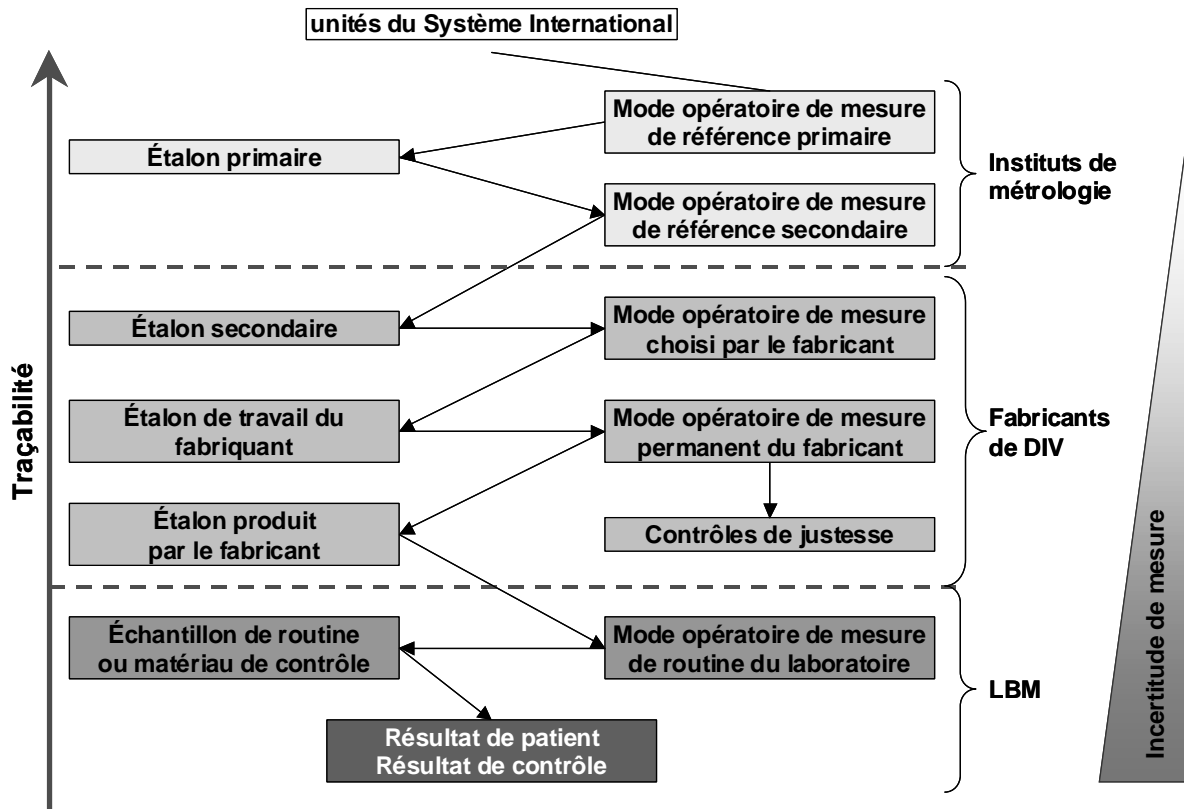


Figure 2 : Traçabilité métrologique (ISO 17511/2003) [18].

Cette directive a été mise en œuvre par le Parlement et le Conseil européens afin d'obtenir des mesures cliniques traçables et justes [19]. Elle requiert que la traçabilité des valeurs attribuées aux matériaux d'étalonnage et/ou échantillons de contrôle de la qualité soit garantie par des méthodes de référence accessibles et/ou des matériaux de référence d'ordre supérieur.

### 3.2. Méthodes de référence et matériaux de référence certifiés

La traçabilité métrologique du résultat de mesure est assurée notamment par le développement de méthodes de référence primaires. D'après la définition fournie par le VIM (Vocabulaire International de Métrologie), une procédure de mesure de référence correspond à une « *procédure de mesure considérée comme fournissant des résultats de mesure adaptés à leur usage prévu pour l'évaluation de la justesse de valeurs mesurées obtenues à partir d'autres procédures de mesure* ».

*pour des grandeurs de la même nature, pour un étalonnage ou pour la caractérisation de matériaux de référence » [15]. Une procédure de mesure primaire correspond à une « procédure de mesure de référence utilisée pour obtenir un résultat de mesure sans relation avec un étalon d'une grandeur de même nature » [15].*

Les méthodes de référence ont donc plusieurs objectifs. Le premier est d'assigner des valeurs à des matériaux de référence (MR). Ces matériaux sont généralement des échantillons dont la matrice est proche de celle des échantillons à analyser. Ils ont pour caractéristique de fournir une valeur stable dans le temps et homogène au sein du matériau pour une période donnée. Ces matériaux sont utilisés afin d'étalonner des appareils de mesure mais aussi afin d'évaluer la justesse des méthodes d'analyse. Les matériaux de référence peuvent aussi être certifiés (MRC) par un laboratoire national de métrologie, c'est-à-dire fournis avec un certificat attestant des valeurs et des incertitudes associées selon une procédure donnée. Les valeurs associées aux MRC sont pour la plupart raccordées aux unités du système international et ont pour rôle d'assurer la traçabilité métrologique des résultats.

Les méthodes de référence sont également utilisées pour assigner des valeurs de référence avec leurs incertitudes associées aux échantillons utilisés lors des évaluations externes de la qualité.

Comme cela a été abordé précédemment, la valeur de cible attribuée lors des essais interlaboratoires est le plus souvent une valeur consensuelle, comme par exemple la moyenne des résultats obtenus par tous les participants. Cette pratique est principalement due à l'absence de méthodes de référence traçables aux unités du système international (SI) pour un grand nombre de biomarqueurs. Malheureusement, cette approche peut entraîner une mauvaise évaluation des performances d'un laboratoire entre autres pour détecter un biais systématique de l'ensemble des laboratoires ou des méthodes mises en œuvre. A titre d'exemple, si tous les laboratoires de biologie médicale sous-estiment leurs résultats, la valeur consensuelle (c'est-à-dire la moyenne générale) sera donc plus basse que la concentration réelle dans l'échantillon et cette sous-estimation ne pourra pas être mise en évidence. Les conséquences peuvent être importantes pour certains patients dont la concentration en analyte dosé est légèrement au-dessus du seuil pathologique et qui ne pourraient pas être dépistés. Il est donc nécessaire de développer des méthodes de référence afin de s'affranchir de ces problèmes.

En biologie médicale, les méthodes de référence ainsi que les MRC existants sont répertoriés par le Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM). Le JCTLM est un comité créé en 2002 suite à l'implémentation de la Directive européenne 98/79/EC. Il regroupe les métrologues, les biologistes médicaux, les organismes d'accréditation ainsi que les industriels.

Actuellement, dans la base de données du JCTLM, sont dénombrés environ 400 matériaux de référence et 150 méthodes de référence pour des composés chimiques et biologiques dont le mesurande, c'est-à-dire « *la grandeur que l'on veut mesurer* » [15], peut être clairement défini et dont les valeurs peuvent être traçables au système international. Ces composés correspondent à

des électrolytes, des enzymes, des hormones, des acides nucléiques, des médicaments, des protéines et des métabolites.

L'utilisation de MRC et l'assignation de valeurs de référence via les méthodes de référence sont indispensables afin d'assurer la traçabilité des résultats fournis par les laboratoires de biologie médicale. Néanmoins, les effets de matrice (notion de commutabilité) associés aux échantillons jouent un rôle fondamental car ils peuvent biaiser les résultats.

### **3.3. Commutabilité**

#### **3.3.1. Définition de la commutabilité**

La commutabilité est définie comme étant l'équivalence des relations mathématiques entre les résultats obtenus par différentes procédures de mesure sur un matériau de référence et sur des échantillons représentatifs d'individus sains et malades [18]. En d'autres termes, la commutabilité d'un échantillon correspond à la capacité de ce dernier à se comporter comme un échantillon natif de patient lorsqu'il est mesuré par plus d'une méthode analytique [20, 21].

Cette définition implique qu'il s'agit d'une caractéristique spécifique à un couple de méthodes de mesure pouvant être formé par deux méthodes utilisées dans les laboratoires de biologie médicale ou par une méthode de routine et une méthode de référence. De ce fait, un matériau pourra être commutable pour un couple de méthodes données mais pas pour un autre. L'utilisation d'un matériau comme contrôle de la justesse lors de contrôle externe de la qualité, ou bien comme matériau d'étalonnage, dépendra alors des méthodes de mesure pour lesquelles il aura été démontré commutable.

Lorsque les appareils de mesure sont étalonnés avec un matériau commutable, les résultats obtenus avec des échantillons cliniques sont équivalents entre toutes les procédures pour lesquelles l'échantillon est trouvé commutable. A contrario, les appareils de mesure étalonnés avec un matériau non commutable auront un biais de mesure par rapport aux échantillons natifs et les résultats obtenus ne seront pas équivalents pour toutes ces procédures [22]. Une étude récente publiée en 2013 par Zegers *et collaborateurs* [23] met en évidence l'importance de disposer de matériaux commutables afin d'étalonner les méthodes de routine. En effet, il a été démontré dans cette publication que les résultats obtenus à partir de méthodes étalonnées avec des échantillons non commutables étaient significativement différents de ceux obtenus à partir de méthodes utilisant un étalon commutable et ne permettaient pas donc pas d'obtenir des résultats équivalents entre différentes méthodes.

Concernant les contrôles de justesse, le biais d'une méthode donnée mesuré sur un échantillon commutable correspondra au biais réel de cette dernière. Lorsque la justesse d'une méthode est

évaluée avec un échantillon non commutable, le biais observé comprendra le biais réel de la méthode mais également celui associé aux effets de matrice. En effet, la non commutabilité d'un matériau est communément attribuée à la différence entre la matrice de ce matériau et celle des échantillons natifs de patients [20, 21, 24]. L'effet matrice est défini comme l'influence des propriétés de l'échantillon, indépendamment de la présence de l'analyte, sur la mesure et donc sur la quantité de composé mesuré [25].

La non commutabilité aura un impact sur l'évaluation de la justesse des mesures cliniques et sur la validation des procédures de mesure. En effet, un grand nombre d'études, dont celles réalisées par Eckfeld *et collaborateurs* [26] et Cattozzo *et collaborateurs* [27] ont démontré que les échantillons de contrôle de la qualité et les échantillons natifs de patients ne permettaient pas de tirer les mêmes conclusions concernant la validation des méthodes testées du fait de leur non commutabilité. Elles ont également prouvé qu'un étalonnage avec un échantillon non commutable causait des erreurs d'interprétation sur des échantillons natifs ayant des concentrations pathologiques trouvées non pathologiques et inversement [28].

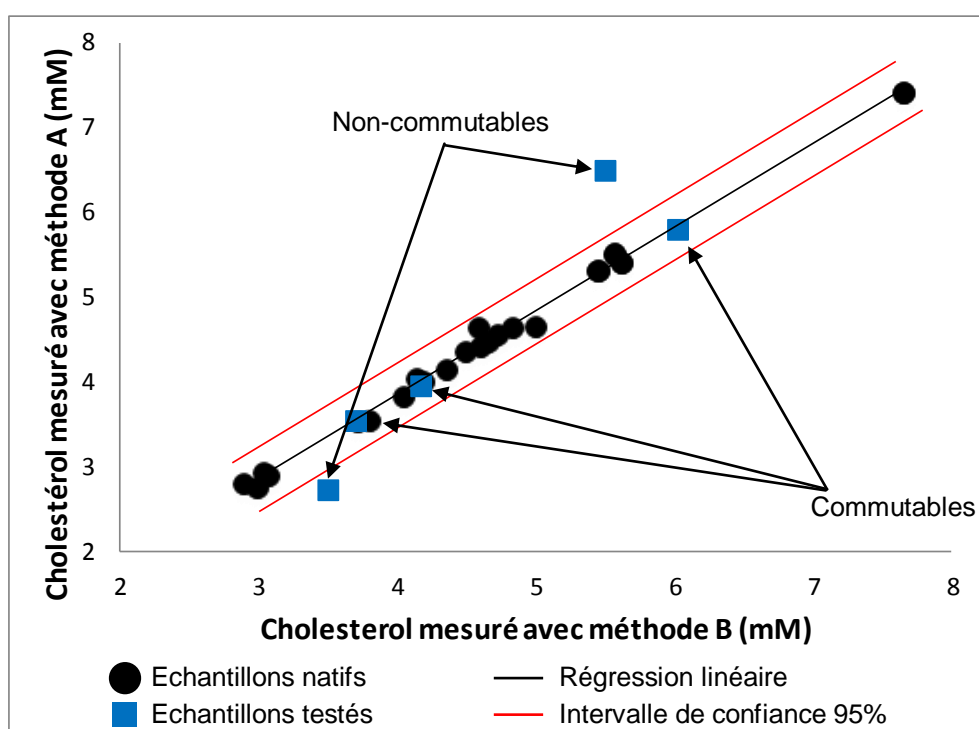
La commutabilité d'un échantillon ne peut pas être prédite mais différents facteurs sont connus pour avoir un effet sur celle-ci. Les plus connus sont la reconstitution de sérum lyophilisé à partir de plasma, l'ajout d'agents stabilisants utilisés afin d'assurer l'intégrité des analytes et d'éviter le développement bactérien [29], la dialyse, la concentration, les cycles de congélation-décongélation [30], la filtration, l'ajout de composés afin d'ajuster la concentration de l'échantillon à une valeur souhaitée [31] et la lyophilisation [21, 24, 32]. La non commutabilité peut donc être une conséquence des propriétés de la matrice, des propriétés de l'analyte mais également de l'interaction entre la matrice et l'analyte. Par exemple, une variation de pH peut engendrer une modification structurale de l'analyte. Afin de préparer des matériaux commutables pour la mesure du cholestérol, le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) a publié une procédure (C37-A) décrivant le protocole de préparation à respecter [33]. Une étude, menée par Cobbaert *et collaborateur* en 2002 [34], a évalué des échantillons préparés selon cette procédure pour le dosage de plusieurs lipoprotéines et apolipoprotéines. Les résultats obtenus ont permis de démontrer que ces échantillons possédaient un degré de commutabilité supérieur à celui obtenu avec des matériaux commercialisés et également à des échantillons préparés suivant d'autres procédures.

### 3.3.2. Comment évaluer la commutabilité d'un matériau ?

Différentes approches ont été décrites dans la littérature afin d'évaluer la commutabilité des matériaux. Elles reposent sur des traitements statistiques qui sont le plus souvent des analyses par

régression. Elles permettent de comparer les relations numériques obtenues par les méthodes utilisées par les LBM pour des échantillons natifs ainsi que des matériaux dont on veut tester la commutabilité. Toutes ces approches ont pour principe général de déterminer une relation mathématique entre les résultats mesurés par deux ou plusieurs méthodes sur des échantillons de sérum natifs. Les échantillons dont on veut tester la commutabilité seront commutables si leur comportement est identique à celui des échantillons natifs. Afin d'homogénéiser ces approches, des procédures ont été publiées en 2009 dans le document CLSI C53-A [35].

Le principe décrit dans ce document repose sur une régression linéaire obtenue à partir d'échantillons natifs de patients mesurés par deux différentes méthodes. Un intervalle de confiance à 95% est ensuite calculé grâce à la distribution de ces échantillons. Les résultats obtenus avec les échantillons dont on veut tester la commutabilité, mesurés avec les mêmes méthodes que les échantillons natifs, sont ensuite comparés à l'intervalle de confiance. Les échantillons se trouvant dans l'intervalle de confiance à 95% sont commutables. Les échantillons hors de l'intervalle de confiance à 95% sont considérés comme ayant des effets matrice tels qu'ils ne sont pas commutables (Figure 3).



**Figure 3 : Principe de l'évaluation de la commutabilité selon le document CLSI C53-A [35].**

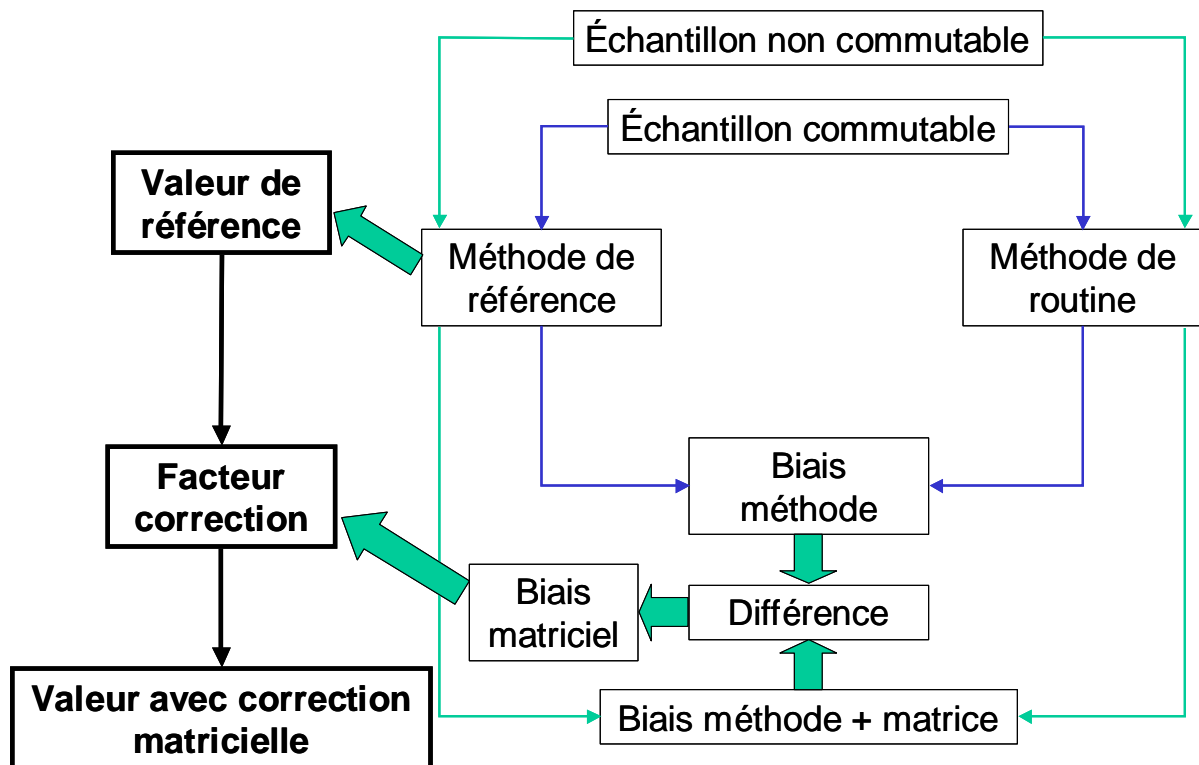
*Une régression linéaire est tracée après analyse d'au moins 20 sérums natifs par deux méthodes différentes.*

*Seuls les échantillons compris dans l'intervalle de confiance à 95% sont commutables*

### 3.3.3. La correction des effets de matrice

Bien que les échantillons non commutables ne puissent pas être directement utilisés comme contrôles de justesse, plusieurs articles scientifiques ont reporté une approche où un facteur correctif des effets de matrice est appliqué [36–38]. Ce facteur correctif est calculé grâce l'utilisation simultanée d'échantillons de contrôle non commutables et d'échantillons natifs de patients uniques ou mélangés. L'analyse de ces échantillons va alors permettre d'assigner une valeur pour laquelle les effets de matrice présents dans les échantillons non commutables ont été corrigés [39].

L'approche régulièrement citée dans la littérature est celle développée par Ross *et collaborateurs* [40] en 1993 à partir de résultats obtenus grâce à la participation de 7000 laboratoires. Son principe est schématisé dans la Figure 4 et indique par quels moyens ont été quantifiés les effets matriciels.



**Figure 4 : Représentation schématique du protocole de correction des effets matriciels et de l'assignation de valeurs cibles corrigées.**

*Le biais matriciel correspond à la différence entre le biais observé sur des échantillons non commutables et celui observé sur des échantillons commutables, tous les deux ayant été déterminés en comparant une méthode de routine à une méthode de référence. La valeur cible corrigée est déterminée en ajustant la valeur de référence obtenue pour l'échantillon non commutable avec le biais matriciel calculé.*



Dans un premier temps, les échantillons de contrôle non commutables ainsi que les échantillons commutables sont analysés à la fois par une méthode de routine et une méthode de référence. Dans la majorité des cas, les échantillons commutables correspondent à des sérums congelés ayant subi un minimum de traitement et pour lesquels un haut niveau de commutabilité est attendu. Concernant les échantillons commutables, la différence entre les résultats obtenus avec la méthode de référence et la méthode de routine correspond au biais d'étalonnage de la méthode. Cette même différence calculée sur les échantillons non commutables correspond quant à elle à la somme du biais d'étalonnage et du biais matriciel. La différence entre le biais d'étalonnage et le biais obtenu sur les échantillons non commutables donne ensuite accès au biais matriciel engendré par la non commutabilité. Ces résultats permettent alors de calculer un facteur correctif de l'effet matriciel couramment déterminé grâce à l'équation développée par Ross (Equation 1).

$$Facteur_{correctif} = (1 + \frac{X_C - C_C}{C_C}) \times \frac{C_{NC}}{X_{NC}} \quad \text{Équation (1)}$$

Avec :

- $X_C$  = concentration de l'échantillon commutable déterminée par un laboratoire
- $X_{NC}$  = concentration de l'échantillon non commutable déterminée par un laboratoire
- $C_C$  = concentration de l'échantillon commutable déterminée par IDMS
- $C_{NC}$  = concentration de l'échantillon non commutable déterminée par IDMS

Le facteur correctif est ensuite appliqué à la concentration obtenue par le laboratoire à partir des échantillons non commutables afin de pouvoir déterminer uniquement le biais d'étalonnage de la méthode utilisée et permettre une évaluation plus rigoureuse de la justesse.

### 3.4. Impact économique

Plusieurs études réalisées dans différents pays ont permis d'évaluer l'impact de la métrologie et les économies réalisées grâce à son développement. Elles ont montré qu'environ 15 % du PIB des pays développés était consacré à des activités liées à la mesure.

En Europe, une « étude sur le rôle économique des mesures et des essais dans la société moderne » [2] a été réalisée en juillet 2002 dans six secteurs différents (nanotechnologie, industrie automobile, industrie pharmaceutique, secteur des gaz naturels en Europe, industrie des matériaux pour le diagnostic *in vitro* et contrôle des émissions et de la pollution dans l'environnement). Cette étude a permis de mettre en lumière les dépenses de l'Union Européenne pour des activités de

mesure. Elles s'élèvent à 83 milliards d'euros par an soit quasiment 1 % du PIB de l'Union Européenne (UE). Cette somme regroupe les investissements dans les laboratoires nationaux de métrologie et les laboratoires d'étalonnage accrédités mais aussi le coût de la certification dans l'industrie, le coût des instruments ainsi que les dépenses de l'industrie consacrées aux mesures. 13 milliards d'euros par an sont ainsi dépensés pour des mesures et des essais dans les services de santé européens.

Des estimations économétriques de l'impact économique des activités de mesure montrent que ces dépenses génèrent presque 230 milliards d'euros de bénéfices directs, soit 2,7 % du PIB de l'UE. Il y a donc un retour sur investissement de 3 contre 1, et cela sans prendre en compte les bénéfices très importants pour la société en termes de santé, sécurité et en environnement. Les laboratoires de métrologie ont donc un impact sur l'économie en maintenant l'infrastructure nationale de mesure, en apportant des aides à l'innovation, en permettant une représentation du pays et une compétition équitable et sûre.

La nécessité de disposer de mesures fiables a été démontrée dans le cas du cholestérol, l'un des principaux biomarqueurs des maladies cardiovasculaires.

En effet, des études effectuées par Mayo Clinic aux Etats-Unis ont permis de mettre au point un modèle statistique qui montre qu'une erreur de 3 % produit une augmentation du taux de diagnostic erroné de 10 %, ayant pour conséquence de nouveaux examens ou une intervention médicale inutile.

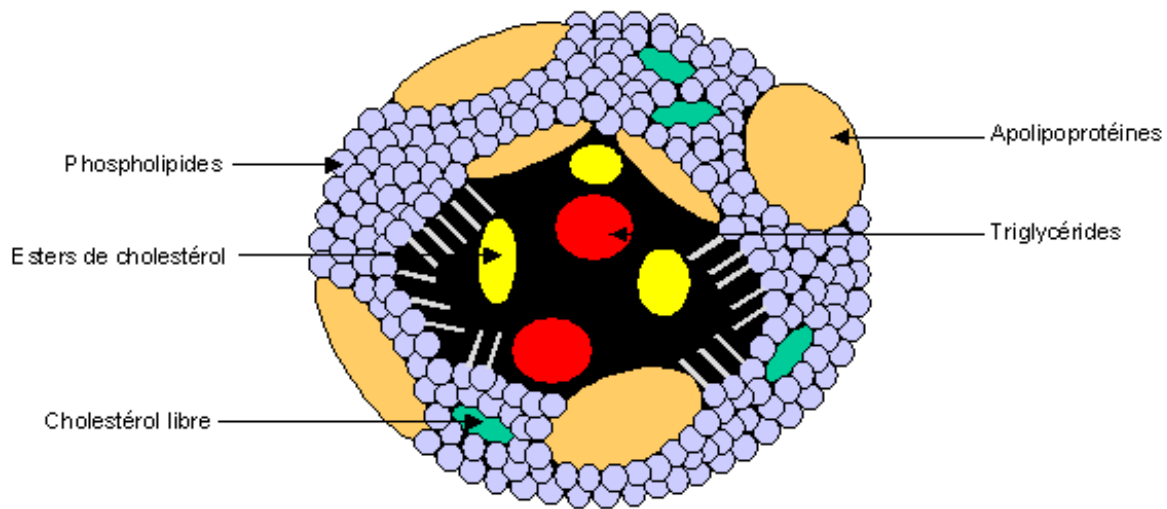
De plus, des études réalisées par le National Institute of Standards and Technology (NIST) et publiées dans le rapport « The Economic Impacts of NIST Cholesterol Standards Program » en 2000 ont chiffré le retour sur investissement et la rentabilité de mesures fiables du cholestérol pour la société. Le retour sur investissement a été estimé à 4,5 : 1 et la rentabilité pour la société de 154% [22]. Ces chiffres soulignent l'importance de disposer de mesures fiables des biomarqueurs lipidiques.

## **II. Les lipoprotéines**

### **1. Structure des lipoprotéines**

Les lipides étant des molécules hydrophobes insolubles dans les milieux biologiques aqueux, ils sont véhiculés à travers les différents compartiments extracellulaires de l'organisme au sein de complexes solubles composés d'une partie protéique et lipidique : les lipoprotéines. Ces lipoprotéines ont une structure sphérique dans laquelle le noyau est constitué de lipides neutres

(triglycérides et esters de cholestérol) entourés par une couche amphiphile composée de phospholipides, de cholestérol non estérifié et d'apolipoprotéines (Figure 5).



**Figure 5 : Composition générale des lipoprotéines.**

*Les lipoprotéines présentent un cœur hydrophobe composé d'esters de cholestérol et de triglycérides et une couche hydrophile composée de phospholipides, cholestérol libre et apolipoprotéines*

Il existe différents types de lipoprotéines plasmatiques pouvant être classées en six populations selon leur densité hydratée [42]. Il s'agit des chylomicrons, des lipoprotéines de très faible densité « very-low-density lipoproteins » (VLDL), des lipoprotéines de densité intermédiaire « intermediate-density lipoproteins » (IDL), des lipoprotéines de faible densité « low-density lipoproteins » (LDL), des lipoprotéines de haute densité « high-density lipoproteins » (HDL) et de la lipoprotéine(a) (Lp(a)).

La Lp(a) correspond à une LDL associée à une apolipoprotéine(a) (apo(a)) via un pont disulfure. L'apo(a), dont la structure est homologue à celle du plasminogène, est une protéine hautement polymorphique composée de domaines peptidiques basiques d'environ 80 acides aminés appelés « kringles ». Chaque apo(a) est composée d'une copie de kringle 5, d'un nombre variable de kringle 4 (K4) et d'un domaine protéase non actif. Il existe 10 formes différentes de K4 qui varient selon leur composition en acides aminés. Les types 1 et 3 à 10 sont retrouvés en une seule copie dans tous les apo(a). Le nombre de K4 de type 2 quant à lui peut varier de 2 à plus de 40 copies [43]. Cette variation va entraîner une modification de la taille de l'apo(a) pouvant aller de 187 kDa pour une apo(a) contenant 12 copies de K4 à 662 kDa pour une apo(a) contenant 50 copies [44].

Ces 6 classes de lipoprotéines diffèrent par leur taille, leur densité, leur charge (mobilité électrophorétique), mais également la proportion relative de leurs différents constituants ainsi que par leur composition en apolipoprotéines. Les lipoprotéines les moins denses (chylomicrons et VLDL) contiennent principalement des triglycérides. Les lipoprotéines de densité plus élevée (LDL et HDL) transportent quant à elles essentiellement des esters de cholestérol (Tableau 1) [45].

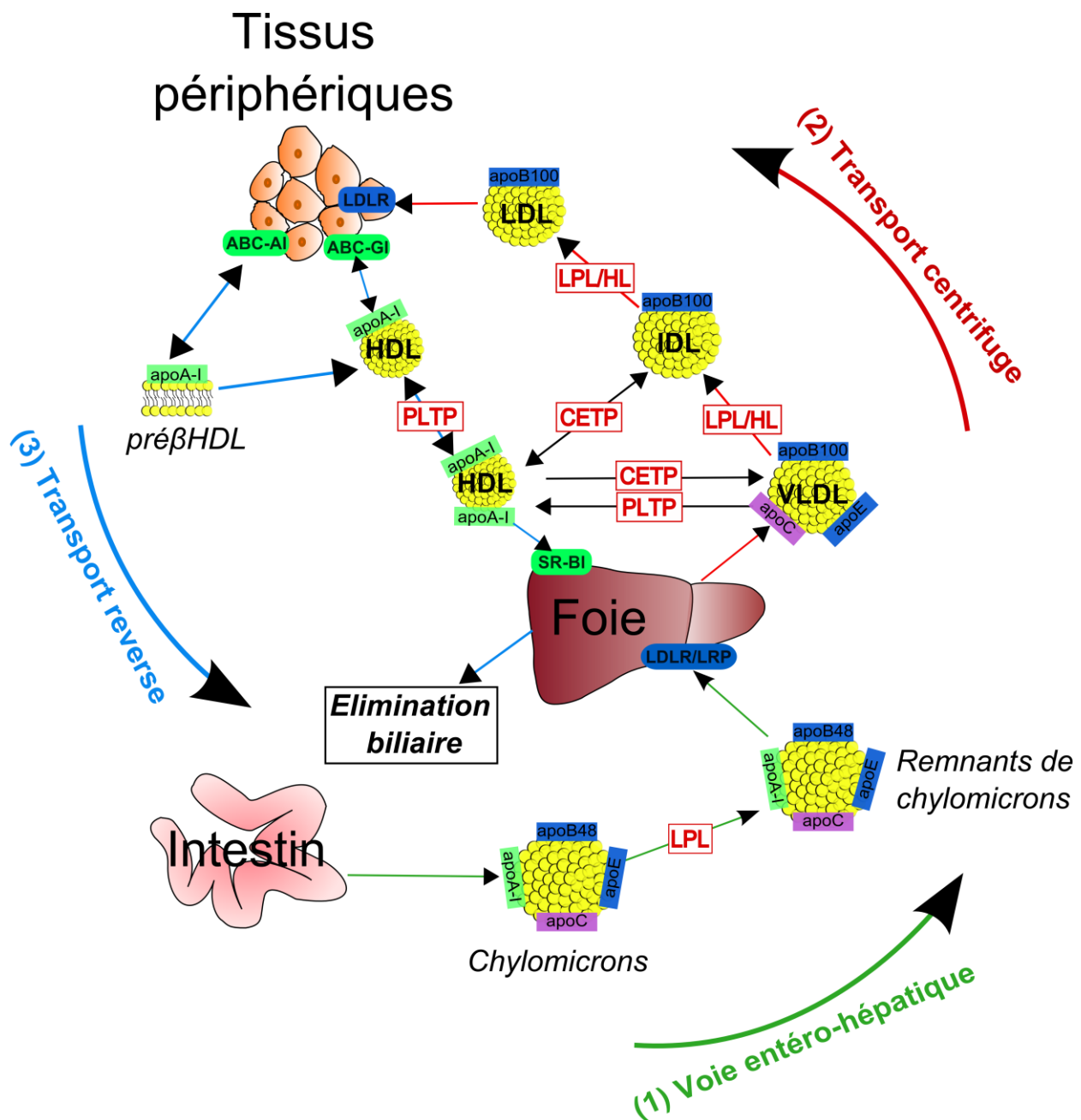
Type de lipoprotéine	Mobilité électrophorétique	Densité (g/mL)	Taille (nm)	Composition				
				Protéines (%)	PL (%)	TG (%)	CT (%)	apolipoprotéines majeures
Chylomicron	pas de migration	0,93	75-1200	2%	7%	86%	5%	B-48, E, C
VLDL	pré- $\beta$	0,93-1,006	30-80	8%	18%	55%	19%	B-100, E, C
IDL	pré- $\beta$ lent	1,006-1,019	27-35	19%	19%	23%	39%	B-100, E
LDL	$\beta$	1,019-1,063	18-27	22%	22%	6%	50%	B-100
HDL2	$\alpha$	1,063-1,125	9-12	40%	33%	5%	22%	AI, AII, C
HDL3	$\alpha$	1,125-1,21	5-9	53%	23%	7%	17%	AI
Lp(a)	entre pré- $\beta$ et $\beta$	1,05-1,12	25-35	29%	16%	11%	44%	B-100, (a)

**Tableau 1 : Caractéristiques physiques et chimiques des lipoprotéines plasmatiques humaines [46].**

*Les lipoprotéines diffèrent par leur mobilité électrophorétique, leur densité ainsi que leur composition protéique et lipidique (PL : phospholipides, TG : triglycérides, CT : cholestérol total).*

## 2. Métabolisme des lipoprotéines

Lorsque l'on considère le métabolisme des lipoprotéines, il est classique de distinguer trois voies de transport des lipides (Figure 6). La première est la voie entéro-hépatique, qui concerne le transport et la distribution des lipides absorbés par l'intestin vers le foie et les tissus périphériques par les chylomicrons (CM). La deuxième voie est celle du transport centrifuge des lipides du foie vers les tissus périphériques via la cascade VLDL-IDL-LDL. Enfin, la troisième voie est celle du transport *reverse* et correspond au retour du cholestérol excédentaire, via les HDL, des tissus périphériques vers le foie où il sera éliminé dans les sécrétions biliaires et les fèces.



**Figure 6 : Métabolisme des lipoprotéines.**

(1) Le cholestérol et les acides gras alimentaires absorbés sont incorporés dans les CM. La lipoprotéine lipase (LPL) hydrolyse les TG des CM. Les remnants de CM formés sont captés par le foie. (2) Le cholestérol est apporté aux tissus périphériques via la voie de transport centrifuge. Les hépatocytes synthétisent puis sécrètent les VLDL riches en TG. La LPL et la HL hydrolysent une partie des TG contenues dans les VLDL les transformant en IDL puis LDL. Les VLDL, IDL et LDL sont reconnues grâce à l'interaction entre l'apoB100 (LDL) ou l'apoE (VLDL/IDL) et les récepteurs de la famille LDLR des cellules périphériques. (3) Le cholestérol excédentaire présent dans les tissus périphériques est transporté vers le foie via la voie de transport reverse du cholestérol. Les pré-βHDL (ou HDL naissantes) interagissent avec les récepteurs ABC-A1 et ABC-G1 de la famille ATP-binding cassette puis se chargent en cholestérol. Les HDL subissent alors un remodelage par la PLTP et la CETP avant d'être captées par le foie via le récepteur SR-BI de la famille des scavenger receptors.

## 2.1. Les Chylomicrons

Les lipides alimentaires sont absorbés au niveau des entérocytes grâce à des mécanismes passifs et/ou actifs. Ces lipides sont ensuite assemblés en chylomicrons (CM) grâce à la *microsomal triglyceride transfer protein* (MTP). L'assemblage des CM, dont l'apolipoprotéine de structure est l'apoB48, peut être divisé en deux étapes principales. Dans un premier temps la MTP se lie à l'apoB48 et assure sa stabilisation et l'acquisition d'une conformation appropriée en lui associant les lipides alimentaires [47]. Dans un second temps, la particule intermédiaire formée fusionne avec une vésicule exclusivement lipidique générée également par la MTP. Le CM mature riche en triglycérides est sécrété dans le milieu extracellulaire [48]. Lors de leur transport intravasculaire, les TG des CM sont en partie hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL). Cette enzyme lipolytique est ancrée à l'endothélium des capillaires sanguins de nombreux tissus périphériques tels que le tissu adipeux, le cœur, les muscles squelettiques et le cerveau [49]. Les acides gras libérés sont captés par les tissus sous-jacents à des fins de catabolisme énergétique ou de stockage. Les *remnants* de CM formés sont ensuite captés par le foie grâce au récepteur des LDL (LDLR) et *au LDL receptor-related protein* (LRP) via l'apoE. Une partie du cholestérol libéré suite à l'hydrolyse hépatique est intégré dans les protéines de très basse densité, les VLDL.

## 2.2. La cascade VLDL-IDL-LDL

Les VLDL sont assemblées dans les hépatocytes, notamment grâce à la MTP et l'apoB100, en suivant un processus très similaire à celui des chylomicrons [48, 50]. Les VLDL sont des lipoprotéines riches en triglycérides dont les apolipoprotéines majeures sont l'apoB100 et l'apoE. Après sécrétion dans le système intravasculaire, elles subissent une hydrolyse de leurs TG par la LPL et la lipase hépatique (*hepatic lipase*, HL). Cette étape entraîne une réduction progressive du cœur hydrophobe des VLDL qui deviennent successivement des lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL) puis des LDL.

En parallèle des étapes d'hydrolyse, ces lipoprotéines subissent un remodelage par des protéines de transfert. Elles sont enrichies en esters de cholestérol grâce à la *cholesteryl ester transfert protein* (CETP). Cette protéine permet le transfert des esters de cholestérol depuis les HDL en échange de triglycérides. La *phospholipid transfer protein* (PLTP) transfère quant à elle des phospholipides de ces lipoprotéines vers les HDL.

Pour finir, les LDL sont reconnues grâce à l'interaction entre l'apoB100 et le récepteur aux LDL et sont internalisées par endocytose, mécanisme qui a été identifié en 1985 par Brown et Goldstein [51]. Une partie des VLDL et des IDL est également reconnue par ce récepteur via l'apoB100 ou

l'apoE. Après internalisation, ces lipoprotéines libèrent les lipides qu'elles contiennent dans les cellules des tissus périphériques ou les hépatocytes.

### 2.3. Les HDL

Les HDL contribuent à maintenir l'homéostasie du cholestérol en permettant l'élimination du cholestérol présent en excès dans les tissus périphériques. Cette voie métabolique spécifique, initialement décrite en 1968 par Glomset [52], est appelée la voie retour du cholestérol, ou transport « *reverse* » du cholestérol.

Au cours de la première étape de ce transport *reverse*, le cholestérol libre cellulaire est transféré vers les HDL natives, également appelées préβHDL. Ces préβHDL sont des particules discoïdales de très haute densité (entre 1,21 et 1,25 g/mL) composées essentiellement d'apoA-I et de quelques molécules de phospholipides. L'efflux de cholestérol libre des cellules vers les HDL se fait selon deux mécanismes. Une partie de cet efflux a lieu grâce à une dilution passive, mais la majorité se fait par un mécanisme actif impliquant des transporteurs protéiques de la famille des *ATP-binding cassette* (ABC-A1 et ABC-G1) ainsi que le récepteur SR-BI de la famille des *scavenger receptors* [53]. La diffusion passive, entraînée par le gradient de concentration en cholestérol libre entre la membrane plasmique et les HDL, est un mécanisme dont la cinétique est lente comparée aux transporteurs protéiques. ABC-A1 interagit avec l'apo-AI des HDL natives pauvres en lipides puis, par un mécanisme ATP-dépendant, permet la translocation de cholestérol libre et de phospholipides vers les préβHDL. ABC-G1 permet quand à lui un efflux préférentiel de cholestérol libre des cellules vers les HDL sphériques. Pour finir, le récepteur SR-BI est également impliqué dans l'efflux du cholestérol mais joue un rôle quantitativement moins important que celui des ABC-A1 et ABC-G1[54].

La deuxième étape du transport *reverse* fait intervenir la *lecithin/cholesterol acyltransferase* (LCAT), dont le principal cofacteur est l'apoA-I. La LCAT estérifie le cholestérol libre à partir des acides gras des phospholipides, le rendant de ce fait hydrophobe. Ce changement de propriétés physico-chimiques induit la transformation des préβHDL en HDL matures sphériques composées d'un cœur hydrophobe contenant les esters de cholestérol [55]. Le transfert de cholestérol supplémentaire au sein des HDL sphériques (HDL3) permet la formation de HDL2 de plus grande taille.

Les HDL sphériques subissent également un remodelage intravasculaire sous l'action de la PLTP qui transfère des phospholipides des lipoprotéines riches en triglycérides vers les HDL. La PLTP favorise également la formation des HDL2 en entraînant la fusion de deux HDL3, générant à cette occasion des pré-βHDL. Des esters de cholestérol sont ensuite transférés par la CETP vers certaines lipoprotéines contenant une apoB en échange de triglycérides. Cette étape permet le retour indirect des esters de cholestérol vers le foie via l'interaction entre les lipoprotéines à apoB

et les récepteurs hépatiques LDLR et LRP. Enfin la lipase hépatique (HL) hydrolyse les triglycérides des HDL aboutissant à la formation de HDL3 de petite taille.

La dernière étape de cette voie métabolique correspond à la clairance hépatique et à l'élimination du cholestérol des HDL dans les sécrétions biliaires. Cette étape est déclenchée par l'interaction entre le récepteur SR-BI et les HDL et induit la libération du cholestérol vers les cellules hépatiques ainsi que la formation de HDL *remnants*. Le cholestérol est finalement éliminé dans les sécrétions biliaires.

### 3. Lipoprotéines et athérosclérose

#### 3.1. Epidémiologie

##### 3.1.1. Définition et prévalence des dyslipidémies

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité et de handicap dans les pays développés. Elles représentent en France 32 % du nombre total de décès par an et plus de 20 % au niveau mondial, ce qui en fait un enjeu majeur de santé publique (Tableau 2).

Cause de décès	Nombre de décès (en millions)	% de décès
<b>Cardiopathie ischémique</b>	<b>7.25</b>	<b>12.80%</b>
<b>AVC et maladies cérébrovasculaires</b>	<b>6.15</b>	<b>10.80%</b>
Infections des voies respiratoires inférieures	3.46	6.10%
Pneumopathie chronique obstructive	3.28	5.80%
Maladies diarrhéiques	2.46	4.30%
VIH/sida	1.78	3.10%
Cancer de la trachée, des bronches ou des poumons	1.39	2.40%
Tuberculose	1.34	2.40%
Diabète sucré	1.26	2.20%
Accidents de la route	1.21	2.10%

**Tableau 2 : Principales causes de décès dans le monde en 2008 [23].**

*Les maladies cardiovasculaires (cardiopathies ischémiques et maladies cérébrovasculaires) sont la première cause de décès dans le monde avec 13,4 millions de morts.*



Il est actuellement bien établi que les dyslipidémies représentent l'un des principaux facteurs de risque cardiovasculaire. Leur dépistage repose principalement sur une analyse appelée « exploration d'une anomalie lipidique » ou « EAL » qui regroupe le dosage de plusieurs composés lipidiques [57]. D'un point de vue économique, l'EAL est la septième analyse la plus couramment réalisée avec plus de 14,5 millions d'analyses faites en 2009. De plus, elle représente la deuxième analyse la plus coûteuse pour la sécurité sociale, avec plus de 113 millions d'euros remboursés, ce qui en fait un enjeu économique important (Tableau 3).

Analyse	Dénombrement en 2007	Dénombrement en 2008	Dénombrement en 2009	Montant remboursé en 2007 (€)	Montant remboursé en 2008 (€)	Montant remboursé en 2009 (€)
Hémogramme	30 273 341	31 676 176	32 725 596	219 891 596	230 134 361	237 872 290
Glucose	20 972 673	21 581 411	21 863 564	41 987 789	43 236 576	24 960 135
Transaminases	15 419 078	16 301 060	16 963 791	68 587 157	72 619 556	69 776 086
Ionogramme	13 701 014	14 767 323	15 773 684	59 193 144	63 701 738	68 006 253
Créatinine	14 389 134	15 128 005	15 697 637	30 125 137	31 644 523	32 815 098
Vitesse de sédimentation	14 727 502	15 130 969	15 360 499	28 529 424	29 312 210	29 761 666
<b>Exploration d'une anomalie lipidique</b>	<b>13 315 580</b>	<b>13 946 430</b>	<b>14 582 829</b>	<b>136 915 036</b>	<b>120 095 824</b>	<b>113 473 645</b>
Prothrombine (INR)	12 483 505	13 151 908	13 657 872	59 885 773	63 102 892	65 559 519
CRP (protéine C réactive)	11 161 255	12 292 560	13 327 871	67 332 547	74 303 031	69 252 523
Gamma glutamyl transferase (gamma GT)	10 429 640	11 167 152	11 849 190	41 060 517	33 989 173	36 062 959

**Tableau 3 : Les 10 analyses médicales les plus réalisées et les plus coûteuses pour la sécurité sociale (régime général).**

*L'analyse la plus réalisée en 2009 est l'hémogramme. L'EAL correspond à la 7<sup>ème</sup>. Les trois premières analyses les plus remboursées sont l'hémogramme, l'EAL et les transaminases.*

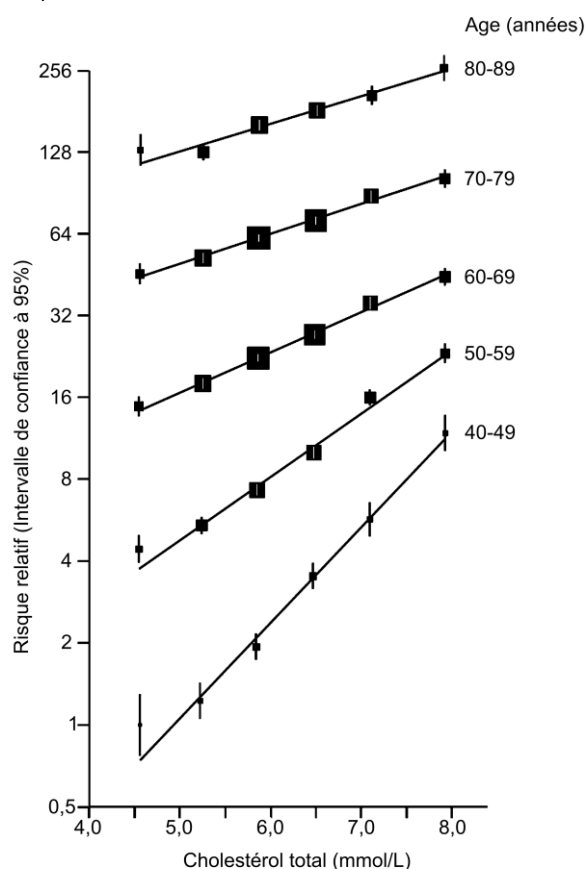
En pratique, l'EAL est réalisée à jeun et comprend la détermination du cholestérol total (CT), des triglycérides (TG), du HDL-cholestérol et du LDL-cholestérol.

Les dyslipidémies se différencient en hypercholestérolémie pure, hypertriglycéridémie pure et hyperlipidémie combinée. L'hypercholestérolémie pure correspond à une concentration en cholestérol total supérieure à 6,2 mmol/L et une concentration en triglycérides inférieure à 2,3 mmol/L alors qu'une hypertriglycéridémie correspond à une concentration en cholestérol total inférieure à 6,2 mmol/L et une concentration en triglycérides supérieure à 2,3 mmol/L.

L'hyperlipidémie mixte se traduit par une concentration en cholestérol supérieure à 6,2 mmol/L et une concentration en triglycérides supérieure à 2,3 mmol/L. Par ailleurs, il existe des hypoHDLémies avec une concentration en HDL-cholestérol inférieure à 1,0 mmol/L chez les hommes et à 1,3 mmol/L chez les femmes. Une étude réalisée en 2005 a permis de déterminer la prévalence des différentes dyslipidémies en France [58]. Les résultats, obtenus chez des sujets âgés de 35 à 64 ans, indiquent que l'hypercholestérolémie pure est l'anomalie la plus souvent rencontrée avec 30 % de la population atteinte. La deuxième anomalie lipidique la plus rencontrée, dans 12 % des cas, est une baisse de la concentration du HDL-cholestérol. L'hyperlipidémie mixte ainsi que l'hypertriglycéridémie pure ont pour leur part une prévalence plus faible, respectivement de 5 et 4 %.

### 3.1.2. Dyslipidémies et risque cardiovasculaire

La relation entre le cholestérol total ou le LDL-cholestérol et le risque cardiovasculaire est clairement établie et a été démontrée grâce à de nombreuses études organisées au cours des 50 dernières années, notamment celle de Framingham menée en 1962 [59, 60]. Il s'agit d'une relation linéaire et sans seuil (Figure 7).

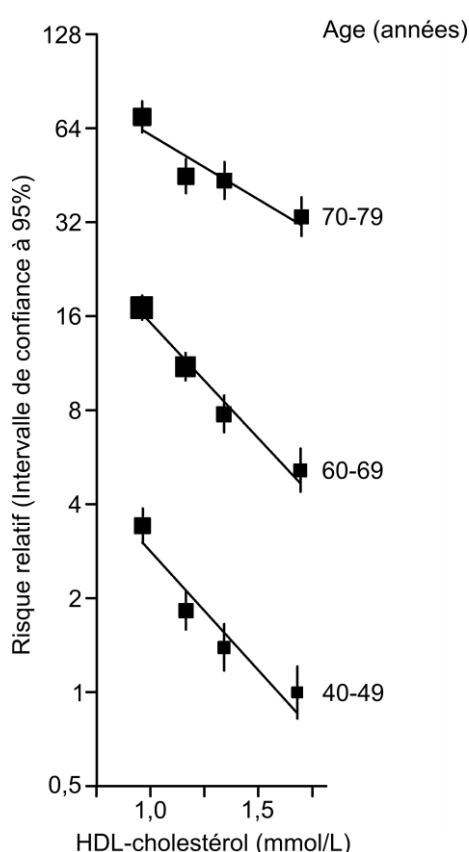


**Figure 7 : Relation entre la concentration en cholestérol total et la mortalité coronaire en fonction de l'âge (33 744 décès) [59].**

Une baisse de la concentration en cholestérol de 1 mmol/L est associée à une diminution de la mortalité coronaire de moitié chez les sujets de 40 à 49 ans, d'un tiers chez les sujets de 50 à 69 ans et d'un sixième chez les individus de plus de 70 ans. Concernant le LDL-cholestérol, les résultats sont très similaires à ceux obtenus avec le cholestérol total. Une réduction de 1 mmol/L de LDL-cholestérol est associée à une diminution d'un tiers de la mortalité coronaire [59].

Il existe également une relation entre la concentration en Lp(a) et le risque coronaire. Une méta-analyse publiée à partir de 31 études prospectives a rapporté un facteur de risque relatif de 1,5 en comparant les participants ayant une concentration en Lp(a) d'environ 50 mg/dL à ceux ayant une concentration d'environ 5 mg/dL [61].

De nombreuses études épidémiologiques ont également établi une relation entre la concentration en HDL-cholestérol et le risque coronaire. Elles ont démontré le pouvoir protecteur des HDL [59]. En 1989, une publication majeure reprenant les données issues de quatre études prospectives américaines a confirmé cette relation [62]. Il a été mis en évidence qu'une augmentation de la concentration en HDL-cholestérol de 0,026 mmol/L diminuait le risque coronaire de 2 % chez l'homme et 3 % chez la femme. Dans la méta-analyse de 2007, une augmentation de 0,3 mmol/L du HDL-cholestérol diminue d'un tiers le risque de survenue de maladies coronariennes (Figure 8).



**Figure 8 : Relation entre la concentration en HDL-cholestérol et la mortalité coronaire en fonction de l'âge (3 020 décès) [59].**

Concernant les triglycéridémies, de nombreuses études de cohorte et méta-analyses ont démontré une relation statistiquement significative entre une augmentation de la concentration en triglycérides et le risque coronaire. Une méta-analyse organisée en 2004 a mis en évidence une augmentation de 70 % du risque de décès par coronaropathies lorsque les participants se situent dans le cinquième supérieur de la concentration en triglycérides comparés aux participants du cinquième le plus bas [63]. Une méta-analyse, organisée en 2007 à partir de 29 études prospectives, a montré que le risque relatif significatif entre les triglycérides élevés et le risque coronaire était de 1,72 lorsque l'on compare les valeurs des triglycérides du dernier tertile par rapport au tertile le plus bas [64].

### 3.1.3. Etudes d'intervention

De nombreuses études de prévention cardiovasculaire ont été réalisées afin de mettre en évidence l'effet bénéfique d'un traitement hypolipémiant sur l'incidence des maladies cardiovasculaires ischémiques.

Différentes études ont démontré un bénéfice important sur la morbidité et la mortalité cardiovasculaire du fait d'une importante réduction de la concentration en LDL-cholestérol grâce à l'utilisation des statines [65–70]. Les résultats obtenus lors d'études de prévention utilisant différents types de statine sont présentés dans le Tableau 4.

Ces données démontrent que la réduction du risque cardiovasculaire est directement corrélée à l'abaissement de la concentration en LDL-cholestérol. Cette relation est retrouvée dans plusieurs méta-analyses dont celle de Law *et collaborateurs* menée en 2003 [71]. Cette étude met en évidence une diminution du risque de cardiopathies ischémiques de 20% lorsque le LDL-cholestérol est réduit de 0,5 mmol/L, de 31% pour 1 mmol/L et de 51% pour 1,6 mmol/L.

Etude	Statine utilisée	Nombre de patients	Suivi moyen (ans)	Dose statine (mg/j)	Evolution LDL-C (%)	Principaux résultats
ASCOT-LLA [65]	Atorvastatine	10 305	3,3	10	-29%	-36% IDM mortels et décès coronaires -27% AVC mortels ou non -13% mortalité totale
LIPS [72]	Fluvastatine	1 677	3,9	80	-27%	-22% événements cardiaques majeurs -31% mortalité totale
AFCAPS/ TexCAPS [67]	Lovastatine	6 605	5,2	20-40	-25%	-37% événement coronaires majeurs -40% IDM mortel ou non pas de réduction de la mortalité totale
LIPID [68]	Pravastatine	9 014	6,1	40	-25%	-24% décès coronaires -19% AVC -29% IDM -22% mortalité totale
JUPITER [69]	Rosuvastatine	17 802	1,9	20	-50%	-44% événements cardiaques majeurs -54% IDM -48% AVC -20% mortalité totale
4S [70]	Simvasatine	4 444	5,4	20-40	-35%	-34% événement coronaires majeurs -30% mortalité totale

**Tableau 4 : Données d'études d'intervention réalisées sur les statines.**

(IDM : infarctus du myocarde ; AVC : accident vasculaire cérébral)

### 3.2. Mécanisme de l'athérosclérose

L'athérosclérose est une pathologie multifactorielle dont l'un des facteurs de risque prépondérants est l'hypercholestérolémie. Elle se caractérise par une inflammation chronique de la paroi artérielle qui se développe en réponse à des dommages affectant l'endothélium vasculaire. Les lésions d'athérosclérose se développent sur les artères de gros et moyen calibre soit de 3 à 0,5 cm de diamètre environ.

L'athérosclérose a été définie en 1958 par l'OMS comme étant « *une association variable de remaniement de l'intima des artères de gros et moyens calibres, consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires, le tout s'accompagnant de modifications de la media* ».

### 3.2.1. Rôle athérogène des lipoprotéines de faible densité

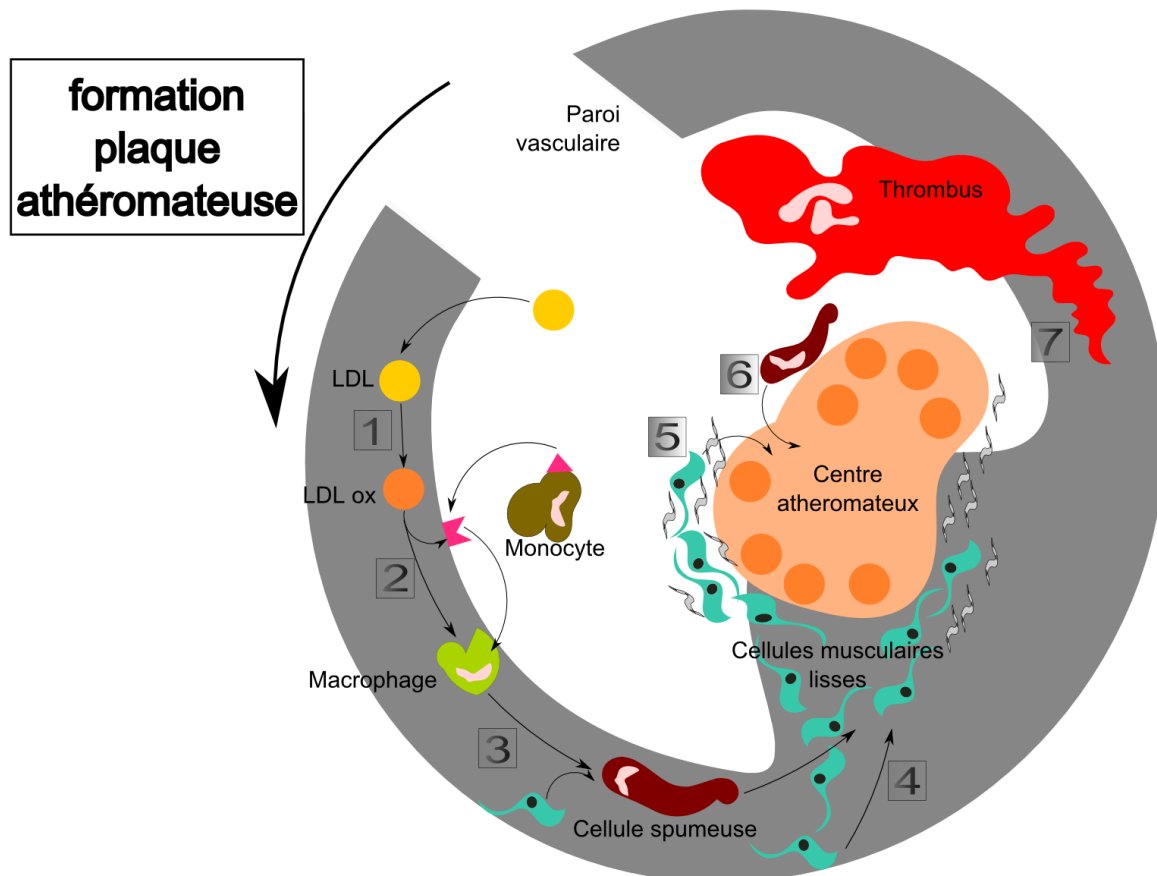
L'athérosclérose se caractérise par l'accumulation dans l'espace sous-endothélial de la paroi vasculaire de cholestérol et de cellules spumeuses correspondant à des macrophages enrichis en cholestérol après captage de lipoprotéines oxydées (Figure 9). La dysfonction endothéliale est actuellement reconnue comme une anomalie précoce jouant un rôle majeur dans l'initiation de la plaque d'athérome. La cellule endothéliale perd ses propriétés anti-athérogènes et facilite au contraire le recrutement de leucocytes par l'expression de molécules d'adhésion, les phénomènes pro-oxydants, proinflammatoires, prothrombotiques et proapoptotiques.

Les LDL constituent la principale classe de lipoprotéines pro-athérogènes. Leur passage vers l'espace sous-endothélial est facilité par différents facteurs tels que l'augmentation de la perméabilité endothéliale, une diminution de la perméabilité de la média ou une concentration plasmatique élevée de LDL. Les facteurs hémodynamiques, par exemple la pression ou les forces de cisaillement de la paroi, jouent également un rôle dans le transfert des LDL [73–76]. Leur rétention dans l'espace sous-endothélial est alors facilitée par une interaction électrostatique entre les protéoglycanes de la matrice extracellulaire et les régions basiques de l'apoB100 [76, 77].

La rétention des LDL dans l'intima favorise leur oxydation, étape essentielle du processus athéromateux. L'oxydation des LDL est une réaction en chaîne déclenchée par une forme hautement réactive de l'oxygène, les radicaux libres. Ces radicaux libres sont d'origines multiples. Ils sont issus d'ions superoxyde, de peroxyde d'hydrogène, de peroxy-nitrite, d'acide hypochloreux et de radicaux hydroxyles [78]. L'oxydation des LDL augmente leur électronégativité avec comme conséquence une perte de la reconnaissance par les récepteurs des LDL [79].

Les LDL oxydées sont reconnues par un autre récepteur dit « éboueur » ou « *scavenger* » situé au niveau de la membrane cytoplasmique des macrophages. Ces macrophages captent préférentiellement les LDL modifiées et se transforment ensuite en cellules spumeuses. L'accumulation des cellules spumeuses dans l'intima aboutit à la formation de stries lipidiques qui se transforment progressivement en plaque fibreuse par un processus analogue à celui de la cicatrisation. Les macrophages secrètent alors des facteurs de croissance qui attirent les cellules musculaires lisses vers l'intima artérielle favorisant la prolifération des plaques fibreuses [80].

Ces plaques se transforment à leur tour progressivement en lésions fibreuses ou nécrotiques suivant que les macrophages éliminent ou non les cellules spumeuses endommagées. Les lésions évoluent ensuite en plaques instables sujettes aux phénomènes de thrombose, c'est-à-dire la rupture de la plaque d'athérome et la formation d'un caillot de sang [81].



**Figure 9 : Mécanisme de formation des plaques athéromateuses.**

(1) Pénétration et oxydation des LDL, (2) Activation monocyttaire et absorption des LDL par les macrophages, (3) Formation des cellules spumeuses, (4) Migration des cellules musculaires lisses vers l'intima, (5) Sécrétion de collagène, fibres élastiques et protéoglycane et accumulation de tissus conjonctif, cellules spumeuses et cellules musculaires lisses, (6) Formation du centre athéromateux, (7) Thrombose.

Des études cliniques ont montré que des individus présentant une concentration importante en LDL petites et denses ont une prévalence accrue de maladies cardiovasculaires et cela même lorsque les concentrations en lipides sont normales, comme par exemple chez certains diabétiques de type 2 [82]. Cela s'explique par l'augmentation de la susceptibilité à l'oxydation des LDL petites et denses, par leur forte affinité pour les protéoglycanes de la paroi artérielle, par leur plus faible affinité pour les récepteurs cellulaires et par leur facilité à pénétrer la barrière endothéliale [83, 84].

L'athérogénicité des IDL et des VLDL a également été démontrée dans différentes études épidémiologiques. Ces dernières ont permis de mettre en évidence une relation entre le nombre de particules d'IDL et VLDL circulantes et la sévérité des maladies cardiovasculaires [85, 86] ainsi qu'une corrélation significative entre le développement de sténoses coronariennes et une augmentation de la concentration en apoC-III au niveau de ces particules [87].

Concernant la Lp(a), sa capacité à se déposer dans la matrice extracellulaire fait d'elle une actrice importante dans l'athérosclérose. Cette lipoprotéine serait plus fortement fixée à la matrice que les LDL du fait de l'interaction à la fois avec l'apo(a) et l'apoB100 contribuant ainsi à la formation et à la progression des plaques athéromateuses [88]. La Lp(a) a également la capacité de se fixer sur différentes protéines de la matrice extracellulaire telles que les fibrines et défensines [89, 90]. Enfin, l'apolipoprotéine(a) a une action pro-thrombotique en inhibant la fibrinolyse [91] et en activant la coagulation [92].

### 3.2.2. Rôle protecteur des HDL

Les mécanismes à l'origine de l'athéroprotection des HDL sont variés. Le plus connu est le transport *reverse* du cholestérol, décrit précédemment, et dont le rôle est de capter le cholestérol au niveau de tissus périphériques et de le ramener au foie pour son élimination biliaire [52]. Les HDL sont également pourvues d'une activité anti-inflammatoire. Cette propriété est due à l'inhibition de l'expression de molécules d'adhésion présentes dans la membrane des cellules endothéliales et impliquées dans le recrutement des cellules inflammatoires dans la paroi vasculaire (selectine E, *Intercellular Adhesion Molecule-1* ICAM-1, *Vascular Adhesion Molecule-1* VCAM-1). Les HDL inhibent également la production de cytokines inflammatoires dont l'interleukine-1 et le TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$* ) [93].

Les HDL exercent un pouvoir antioxydant sur les LDL. Les mécanismes principaux de cette protection reposent sur le pouvoir réducteur de l'apoA-I et la présence de certaines molécules associées aux HDL [94]. Concernant l'apoA-I, le pouvoir antioxydant est expliqué par la réduction des lipides peroxydés par les résidus méthionines contenus dans l'apoA-I. Parmi les molécules associées aux HDL, la paraoxonase 1 (PON1) et la *Platelet-Activating Factor-Acetyl Hydrolase* (PAF-AH) permettent de protéger les LDL de l'oxydation.

L'athéroprotection des HDL est également expliquée par son effet antithrombotique. Les HDL s'opposent à ces phénomènes thrombotiques en inhibant l'agrégation plaquettaire, la coagulation mais également en activant la fibrinolyse.

Pour finir, les HDL jouent un rôle important dans la préservation de l'intégrité de l'endothélium. Elles exercent un effet antiapoptotique sur les cellules endothéliales et favorisent en parallèle la



réparation de l'endothélium lésé grâce à la prolifération et la migration de progéniteurs de cellules endothéliales.

### 3.3. Traitement et seuils thérapeutiques

Il est prouvé que le meilleur indicateur d'efficacité de la prévention cardiovasculaire par les hypolipémiants est l'abaissement de la concentration sérique de LDL-cholestérol. C'est à partir de ce paramètre qu'il a été décidé de définir les recommandations de dépistage et de prise en charge des patients dyslipidémiques.

D'après les recommandations de l'AFSSAPS publiées en 2005 sur « *La prise en charge thérapeutique du patient dyslipidémique* » des valeurs seuils du LDL-cholestérol pour l'intervention médicamenteuse ont été fixées [95] (Tableau 5).

Ces valeurs seuils diffèrent en fonction de la présence ou de l'absence de facteurs de risque cardiovasculaire supplémentaires. Ces facteurs de risque sont répertoriés dans le Tableau 6. Une concentration en HDL-cholestérol supérieure à 1,55 mmol/L est quant à elle considérée comme étant un facteur protecteur [96] (Tableau 6).

Type de prévention		LDL-cholestérol (mmol/L)
Prévention primaire	Sujets sans autre facteur de risque	< 5,7
	Sujets ayant un autre facteur de risque	< 4,9
	Sujets ayant deux autres facteurs de risque	< 4,1
	Sujets ayant plus de deux autres facteurs de risque	< 3,4
Prévention secondaire	Sujets ayant une maladie coronaire	< 2,6

**Tableau 5 : Valeurs seuil de LDL-cholestérol nécessitant une intervention médicamenteuse.**

*Plus le nombre de facteurs de risque est important chez les sujets et plus les valeurs seuils en LDL-cholestérol sont basses.*

Facteurs de risque	Age : Homme $\geq 50$ ans ou Femme $\geq 60$ ans ou ménopausée
	Antécédents familiaux de maladie coronaire précoce :
	- Infarctus du myocarde ou mort subite avant l'âge de 55 ans chez le père ou chez un parent du 1 <sup>er</sup> degré de sexe masculin
	- Infarctus du myocarde ou mort subite avant l'âge de 65 ans chez la mère ou chez un parent du 1 <sup>er</sup> degré de sexe féminin
	Tabagisme actuel ou arrêté depuis moins de 3 ans
	Hypertension artérielle permanente traitée ou non
Facteur protecteur	Diabète de type 2 traité ou non
	HDL-cholestérol $< 1,0$ mmol/L
	HDL-cholestérol $\geq 1,5$ mmol/L

**Tableau 6 : Facteurs de risque et facteur protecteur de l'athérosclérose.**

Lorsque les valeurs seuils de LDL-cholestérol sont dépassées, un traitement médicamenteux hypolipémiant est instauré. En France la vente de ces différents médicaments hypolipémiants a augmenté de près de 70 % entre 1999 et 2009. En effet, après une phase de stabilisation observée entre 2005 et 2007, la consommation d'hypolipémiants a de nouveau significativement progressé en 2008 ainsi qu'en 2009 [97]. En 2008, le montant remboursé pour le Régime général avec les sections locales mutualistes, était de 996 millions d'euros soit environ 5,2 % du montant total des médicaments remboursés [98].

### **III. Méthodes de dosage pour les biomarqueurs du bilan lipidique**

Les dyslipidémies, qui sont un facteur de risque important des maladies cardiovasculaires, sont dépistées par l'EAL qui regroupe le dosage du cholestérol total, du LDL-cholestérol, du HDL-cholestérol et des triglycérides. Dans ce chapitre sont développées les méthodes utilisées par les laboratoires de biologie pour le dosage de ces différents biomarqueurs, ainsi que les méthodes de référence existantes, ces dernières permettant d'évaluer la fiabilité des méthodes de routine et d'assurer la traçabilité des analyses.

#### **1. Méthodes de dosage du cholestérol total**

En 1988 aux Etats-Unis, le « National Cholesterol Education Program » (NCEP) a réuni une commission d'experts sur la détection, l'évaluation et le traitement de l'hypercholestérolémie chez l'adulte. Ces experts ont ensuite établi des recommandations concernant le traitement de ces individus en s'appuyant sur la mise en évidence de la relation directe entre une augmentation de la concentration en cholestérol total et le développement de maladies cardiovasculaires [99]. Le cholestérol total (CT) correspond au cholestérol présent sous forme libre mais aussi estérifiée au niveau du cœur hydrophobe des différentes lipoprotéines.

## **1.1. Méthodes de dosage utilisées par les laboratoires de biologie médicale**

Au sein du NCEP, une commission a été instaurée afin de mettre en place et d'évaluer la standardisation des analyses réalisées au sein des laboratoires de biologie médicale aux Etats-Unis. Cette commission a publié en 1988 le premier rapport établissant des directives sur la justesse et la précision des mesures de concentration du cholestérol total [100]. Depuis 1992, il est recommandé aux laboratoires de biologie médicale d'avoir un biais relatif par rapport à la valeur de référence de moins de 3 %. La fidélité intermédiaire, déterminée par le calcul du coefficient de variation (CV), doit être inférieure à 3 % et l'erreur totale inférieure à 9 %. L'erreur totale (ET), calculée en pourcentage, correspond à la somme du CV multiplié par 2 et du biais exprimés en pourcentage.

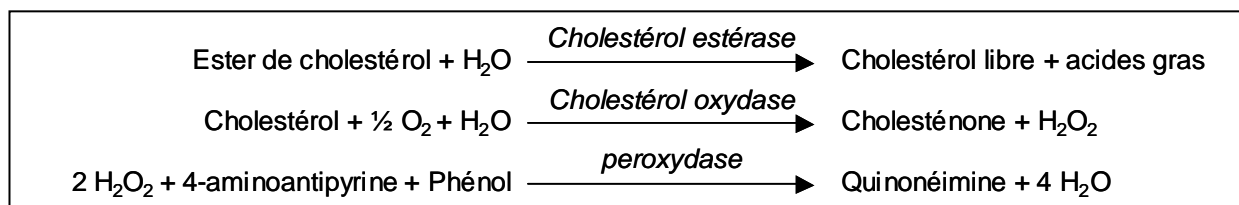
Les techniques de dosage du cholestérol total utilisées actuellement dans les laboratoires de biologie médicale sont toutes des méthodes utilisant une réaction enzymatique entraînant une coloration mesurée par spectrométrie. Les méthodes peuvent cependant être divisées en deux groupes principaux, celles utilisant un chromogène phénolique et celles utilisant un chromogène non phénolique. Dans la majorité des cas (76 %), la technique utilisée est la spectrophotométrie avec réaction indicatrice utilisant une peroxydase (POD) et un chromogène phénolique. 11 % des laboratoires de biologie médicale utilisent la spectrophotométrie et 13 % utilisent la spectro-réflexométrie avec pour ces deux approches une réaction indicatrice à l'aide d'un chromogène non phénolique [101].

Les méthodes enzymatiques ont comme avantages d'être spécifiques, de ne pas nécessiter de produit chimique corrosif et d'être facilement adaptables à l'automatisation. La quantification du chromogène formé peut être réalisée en mode cinétique ou en point final. Dans le mode cinétique le changement de concentration du cholestérol est mesuré au cours du temps durant toute la durée de la réaction enzymatique. La pente de la droite obtenue est alors définie. La méthode en point final consiste quant à elle à utiliser une durée de réaction suffisamment importante afin que la transformation du cholestérol soit totale. Cette dernière approche est plus précise et moins coûteuse en réactif que la méthode cinétique c'est pourquoi elle est préférentiellement utilisée par les laboratoires de biologie médicale [102].

### **1.1.1. Méthodes utilisant un chromogène phénolique**

Ces méthodes reposent sur l'action de deux enzymes : la cholestérol estérase et la cholestérol oxydase (Figure 10). Ces dernières dégradent les esters de cholestérol et le cholestérol libre en cholesténone et le peroxyde d'hydrogène formé réagit alors avec le chromogène phénolique en

présence de peroxydase. Le chromogène phénolique utilisé est la 4-aminoantipyrine et entraîne une coloration rouge de la solution, dont l'intensité est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 512 nm, et est directement proportionnelle à la concentration en cholestérol.



**Figure 10 : Réaction enzymatique utilisant un chromogène phénolique.**

*Le cholestérol est libéré et oxydé sous l'action de la cholestérol estérase et la cholestérol oxydase. Le peroxyde d'hydrogène formé réagit avec la 4-aminoantipyrine et le phénol entraînant une coloration de la solution.*

#### 1.1.2. Méthodes utilisant un chromogène non phénolique

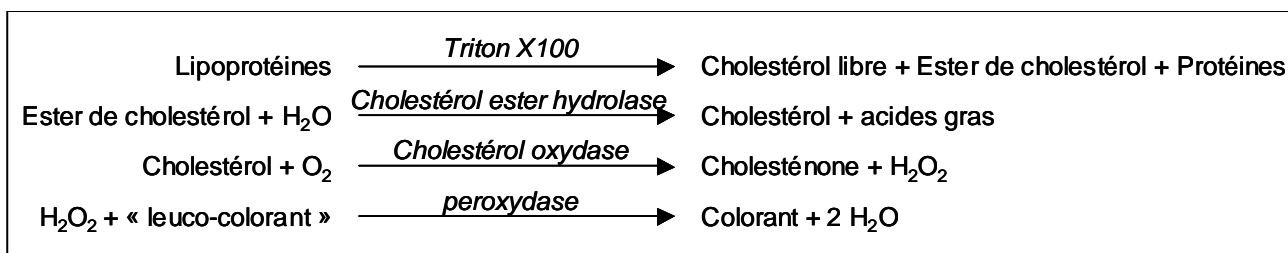
Il existe actuellement deux types de méthodes utilisant un chromogène non phénolique, une méthode par spectrorélectrométrie et une méthode de spectrophotométrie.

##### 1.1.2.a. *Spectrorélectrométrie utilisant un chromogène non phénolique*

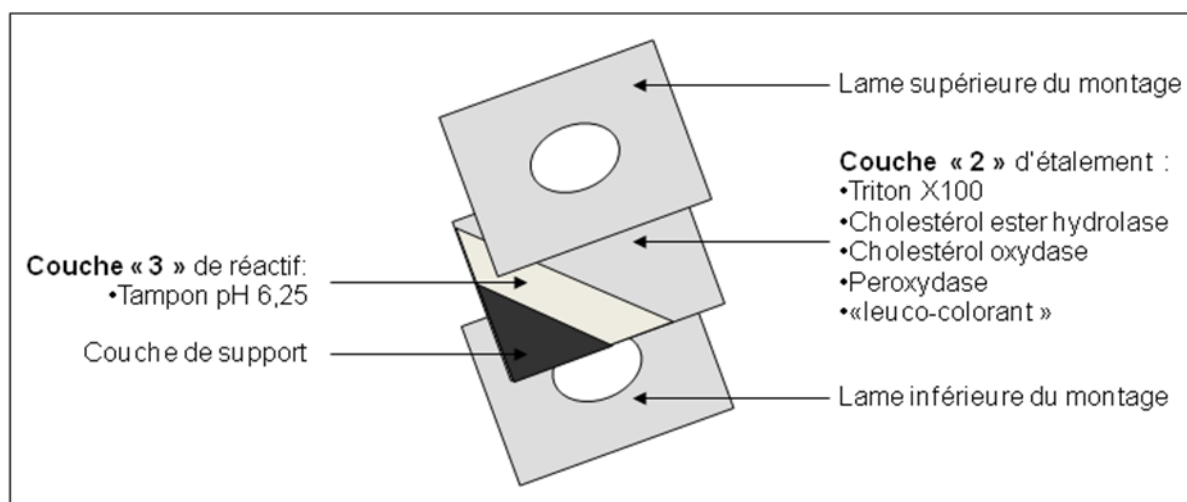
Le principe de cette méthode est proche de celui utilisant un chromogène phénolique. Le peroxyde d'hydrogène oxyde un « leuco colorant » en présence de peroxydase, ce qui colore la solution proportionnellement à la concentration en cholestérol présent dans l'échantillon. La détection utilise non pas la spectrophotométrie mais la spectro-reflectométrie à 540 nm qui mesure la quantité de lumière réfléchi. La réflectance sera d'autant plus forte que la concentration en chromogène oxydé est faible (Figure 11) [103].

Actuellement cette méthode est uniquement mise en œuvre par le système Vitros (Ortho-CD). D'un point de vue pratique, elle utilise un élément analytique multicouche recouvrant un support polyester (Figure 11). Une goutte de l'échantillon est déposée puis étalée de la couche « 2 » vers la couche « 3 ». La couche « 2 » contient les différents réactifs enzymatiques ainsi que le Triton X-100. Le Triton est un détergent qui permet de dissocier le cholestérol et les esters de cholestérol des lipoprotéines présentes dans l'échantillon afin de faciliter les réactions enzymatiques. La couche « 3 » contient quant à elle les réactifs permettant d'obtenir la coloration de la solution.

A.



B.

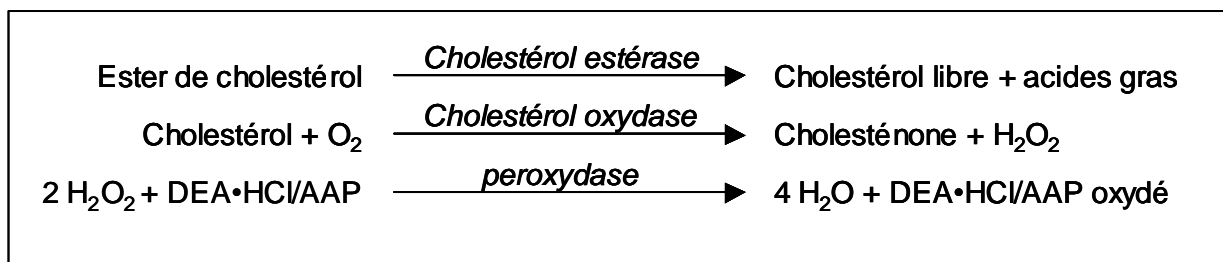


**Figure 11 : Principe de la spectroréflexométrie, A. Réaction utilisant un chromogène non phénolique, B. Schéma du support multicouche.**

*Les réactions enzymatiques ont lieu au niveau de la couche d' «étalement». Le triton X100 libère le cholestérol qui est hydrolysé puis oxydé. Le peroxyde d'hydrogène réagit alors avec un leuco-colorant entraînant une coloration de la solution [104].*

### 1.1.2. b. Spectrophotométrie utilisant un chromogène non phénolique

Cette méthode de spectrophotométrie est mise en œuvre exclusivement sur le système Dimension/Vista (Siemens). Elle utilise comme réactif non phénolique le N,N-diéthylaniline-HCl/aminoantipyrine (DEA•HCl/AAP) qui est oxydé par le peroxyde d'hydrogène issu de l'oxydation du cholestérol. Cette réaction est possible grâce à la présence d'une peroxydase qui produit un chromogène ayant une absorbance à 540 nm (Figure 12). L'absorbance mesurée par spectrophotométrie est directement proportionnelle à la concentration en cholestérol total.



**Figure 12 : Réaction de dosage du cholestérol par spectrophotométrie utilisant un chromogène non phénolique.**

*Le cholestérol estérifié est libéré puis oxydé. Le peroxyde d'hydrogène produit oxyde le N,N-diéthylaniline-HCl/aminoantipyrine et entraîne une coloration de la solution mesurée par spectrophotométrie.*

### 1.1.3. Interférences

Ces différentes méthodes reposent toutes sur une réaction catalysée par la peroxydase. Du fait de la non spécificité de cette enzyme, un grand nombre de substances interférentes ont été identifiées. Il s'agit principalement de l'acide ascorbique, de la bilirubine, des triglycérides et de l'hémoglobine [105–107].

L'acide ascorbique, qui est un agent réducteur, ainsi que la bilirubine sont en compétition avec le substrat chromogénique lors de la réaction de peroxydation. De ce fait, des concentrations élevées en acide ascorbique et bilirubine entraînent une sous-estimation de la concentration en cholestérol total. Des concentrations importantes en triglycérides causent une turbidité entraînant des interférences lors de la mesure. L'interférence de l'hémoglobine est quant à elle principalement due à sa coloration. Elle peut poser problèmes si l'appareil n'est pas capable de faire un « blanc échantillon » en le soustrayant à la mesure. Ainsi, des concentrations importantes en hémoglobine entraînent une surestimation de la concentration en cholestérol total.

## 1.2. Méthodes de référence

Comme développé précédemment dans le Chapitre I, la traçabilité des résultats utilisés par les laboratoires de biologie médicale est réalisée via des méthodes de référence. Ces méthodes de référence sont définies par le Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM) mais aussi développées en interne par des laboratoires nationaux de métrologie ainsi que certains laboratoires de référence.

Pour le dosage du cholestérol total, les méthodes de référence actuellement utilisées sont basées sur deux techniques : la spectrophotométrie et la dilution isotopique associée à la chromatographie (en phase gazeuse ou liquide) couplée à la spectrométrie de masse (ID-GC/MS ou ID-LC/MS) (Tableau 7).

### 1.2.1. Méthode de référence par spectrophotométrie

La première méthode de dosage du cholestérol a été décrite par Liebermann en 1885 [108] et par Burchard en 1889 [109]. Dans la réaction de Liebermann-Burchard, le cholestérol est mis en présence d'acide acétique, d'anhydride acétique et d'acide sulfurique concentrés. Il va alors former un dérivé coloré bleu-vert constitué d'hydrocarbures insaturés polymérisés. Cette méthode a par la suite été modifiée par Abel et Kendall en 1951 [110]. Son principe repose sur une saponification avec une solution alcoolique de potasse alcoolique (KOH) suivie d'une extraction du cholestérol avec de l'hexane. Le réactif de Liebermann-Burchard est alors ajouté et va réagir avec le cholestérol. L'absorbance, qui est proportionnelle à la concentration en cholestérol, est ensuite mesurée par spectrophotométrie à 620 nm.

Cette première méthode de référence a deux limitations majeures. La première est sa non-spécificité car elle mesure des stérols autres que le cholestérol ainsi que certains précurseurs du cholestérol. La concentration en cholestérol sera donc surestimée. Un article publié par Edwards *et collaborateurs* en 2011 [111] montre que la méthode d'Abel-Kendall a un biais moyen de +1,6 % contre la méthode par ID-GC/MS, pouvant aller jusqu'à 2,9%. La seconde limitation est l'utilisation de réactifs corrosifs. De plus, elle est maintenant désuète depuis le développement et l'utilisation d'une détection beaucoup plus spécifique : la spectrométrie de masse.

<b>Spectrophotometry method for cholesterol in blood serum</b>	
▸ CDC Abell-Kendall method for cholesterol	
Applicable matrice(s)	lyophilized, fresh, or frozen human serum
Full description of technique(s)	Spectrophotometry
Quantity	Amount-of-substance concentration
Applicable range	0.65 mmol/l to 10.3 mmol/l
Expected uncertainty (level of confidence 95%)	0.12 % to 0.66 %
Reference(s)	Cooper, GR, et al., <i>Clin. Chem.</i> , 1986, <b>32</b> , 921-929
Comparability assessment study(ies)	<i>Clin. Chem.</i> , 1990, <b>36</b> , 370-375
Comment(s)	The expanded uncertainty is relative
JCTLM DB identification number	NRMeth 32
<b>Isotope dilution mass spectrometry methods for cholesterol in blood serum</b>	
▸ DGKC definitive method for serum cholesterol	
Applicable matrice(s)	lyophilized, fresh, or frozen human serum or plasma
Full description of technique(s)	ID/GC/MS
Quantity	Amount-of-substance concentration
Applicable range	2 mmol/l to 10 mmol/l
Expected uncertainty (level of confidence 95%)	0.5 % to 1.5 %
Reference(s)	Siekmann et al., <i>Z. anal. Chem.</i> , 1976, <b>279</b> , 145-146
Comparability assessment study(ies)	<i>Metrologia</i> , 2004, <b>39</b> , <i>Tech. Suppl.</i> , 08001
Comment(s)	The expanded uncertainty is relative
JCTLM DB identification number	NRMeth 46
▸ Isotope dilution of cholesterol by LCMS, Org-005	
Applicable matrice(s)	lyophilized or frozen serum
Full description of technique(s)	Isotope dilution LCMS
Quantity	Mass fraction
Applicable range	1 mg/g to 3 mg/g
Expected uncertainty	0.2 % to 1 %
Reference(s)	<i>Rapid Commun. Mass Spectrom.</i> , 2002, <b>16</b> , 848-853
Comparability assessment study(ies)	<i>Metrologia</i> , 2004, <b>39</b> , <i>Tech. Suppl.</i> , 08001 IMEP-17
Comment(s)	The expanded uncertainty is relative
JCTLM DB identification number	CYC_II_L_I_RMP_06
▸ NIST definitive method for serum cholesterol	
Applicable matrice(s)	lyophilized, fresh, or frozen human serum
Full description of technique(s)	ID/GC/MS
Quantity	Amount-of-substance concentration
Applicable range	2 mmol/l to 10 mmol/l
Expected uncertainty (level of confidence 95%)	0.5 % to 1 %
Reference(s)	<i>Anal. Chem.</i> , 1989, <b>61</b> , 1718-1723
Comparability assessment study(ies)	<i>Metrologia</i> , 2004, <b>39</b> , <i>Tech. Suppl.</i> , 08001 <i>Clin. Chem.</i> , 1990, <b>36</b> , 370-375
Comment(s)	The expanded uncertainty is relative
JCTLM DB identification number	NRMeth 81
▸ University of Ghent reference method for cholesterol	
Applicable matrice(s)	lyophilized, fresh, or frozen human serum
Full description of technique(s)	ID/GC/MS
Quantity	Amount-of-substance concentration
Applicable range	1 mmol/l to 10 mmol/l
Expected uncertainty (level of confidence 95%)	1 % to 2 %
Reference(s)	<i>Clin. Chem.</i> , 1993, <b>39</b> , 1001-1006 <i>Clin. Chem.</i> , 1993, <b>39</b> , 993-1000 <i>Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.</i> , 1996, <b>34</b> , 853-860 <i>Clin. Chem.</i> , 1996, <b>42</b> , 531-535
Comparability assessment study(ies)	EUROMET 563
Comment(s)	The expanded uncertainty is relative
JCTLM DB identification number	NRMeth 2

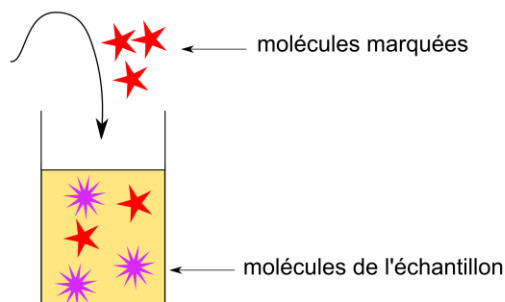
**Tableau 7 : Méthodes de référence pour le dosage du cholestérol total répertoriées par le JCTLM.**



### 1.2.2. Méthodes de référence par dilution isotopique

Le principe de la dilution isotopique est basé sur la détermination de la concentration ou fraction d'un composé contenu dans un échantillon grâce à l'ajout d'une quantité connue de ce même composé marqué en substituant un ou plusieurs atomes par un isotope stable ( $^{12}\text{C}$  par  $^{13}\text{C}$ , H par  $^2\text{H}$ ,  $^{14}\text{N}$  par  $^{15}\text{N}$ ,  $^{16}\text{O}$  par  $^{18}\text{O}$ ). La molécule marquée ajoutée avant les différentes étapes de préparation de l'échantillon devra avoir le même comportement que la molécule non marquée. Lors de la fragmentation des molécules dans le spectromètre de masse, le rapport entre l'intensité du signal ( $m/z$ ) des fragments caractéristiques de la molécule marquée et celle de la molécule non marquée est proportionnel au rapport de quantité de matière entre le composé marqué et non marqué. La concentration du composé non marqué est alors déduite à l'aide d'une courbe d'étalonnage (Figure 13).

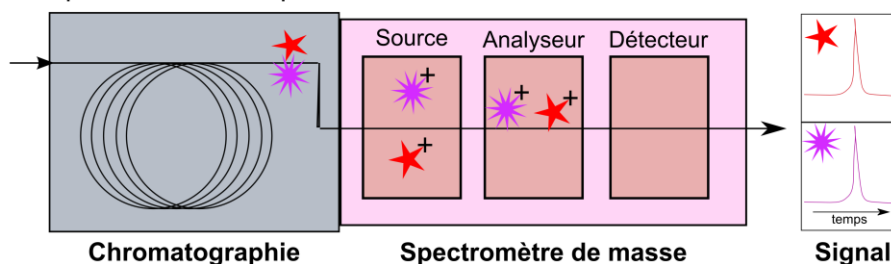
#### 1. Ajout d'une quantité connue de molécules marquées



#### 2. Préparation de l'échantillon



#### 3. Séparation des composés et détection des ions

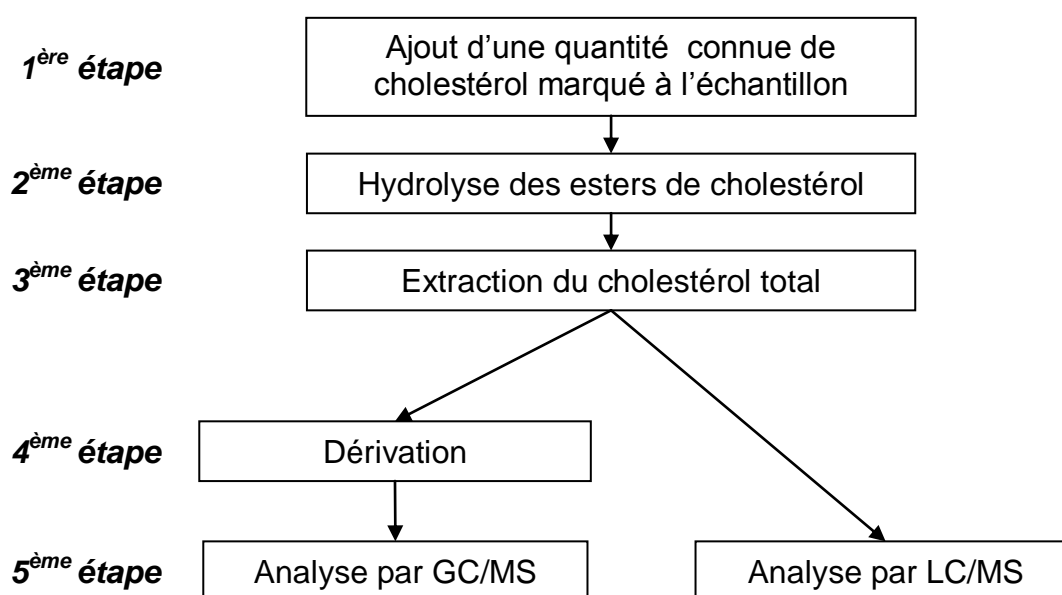


**Figure 13 : Principe de la dilution isotopique associée à la chromatographie en phase gazeuse ou liquide couplée à un spectromètre de masse (ID-GC/MS ou ID-LC/MS).**

*Une quantité connue de molécules identiques à celles à doser et marquées avec un isotope stable est ajoutée à l'échantillon avant les étapes de préparation et de séparation chromatographique (LC ou GC). La détection se fait grâce au spectromètre de masse et le rapport entre l'intensité de l'ion correspondant à la molécule non-marquée sur celle de la molécule marquée permet de déterminer la quantité de la molécule non marquée initialement présente dans l'échantillon.*

La majorité des méthodes de référence reposent sur ce principe, qui peut être décomposé en différentes étapes. En effet, pour le dosage du cholestérol total les principales étapes de préparation et d'analyse des échantillons sont très similaires entre les différentes méthodes existantes. Une première étape consiste à ajouter le cholestérol marqué à l'échantillon de sérum. Ensuite, une étape d'hydrolyse est réalisée avec une solution de KOH alcoolique afin de libérer le cholestérol présent sous forme estérifiée au niveau du cœur hydrophobe des lipoprotéines. Le cholestérol total, c'est-à-dire la somme du cholestérol présent sous forme libre dans le sérum mais aussi le cholestérol libéré lors de l'hydrolyse, est ensuite extrait grâce à un mélange d'eau et d'hexane.

Les différences majeures entre les différentes méthodes de référence concernent leur principe de séparation chromatographique (en phase gazeuse ou en phase liquide), le volume et la durée d'hydrolyse et dans le cas d'une séparation par chromatographie en phase gazeuse, les réactifs utilisés pour la dérivation ainsi que la durée de réaction. Cette étape est réalisée afin de rendre le cholestérol thermiquement stable et volatil. Après l'étape de séparation chromatographique, le cholestérol est détecté par spectrométrie de masse. Ces différentes étapes développées ci-après sont résumées sur la Figure 14.

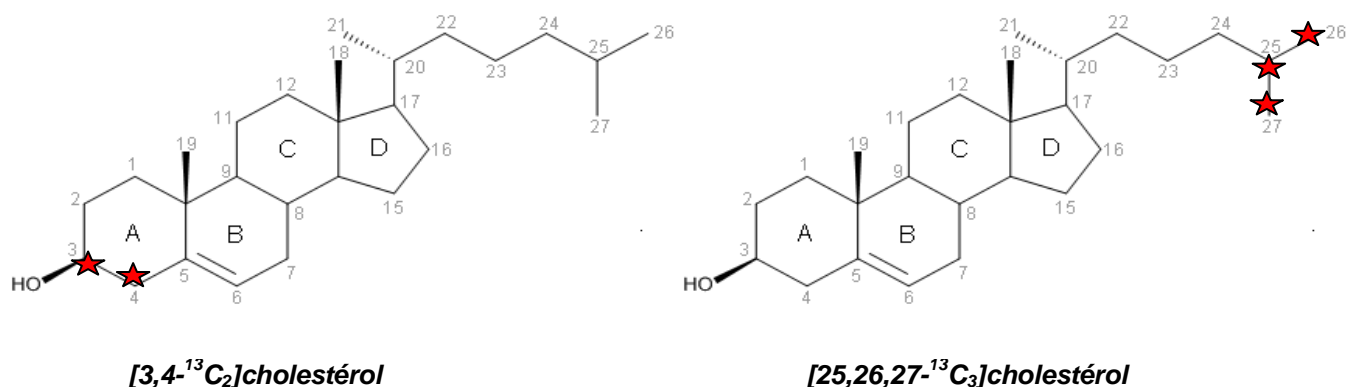


**Figure 14 : Les principales étapes communes aux méthodes de référence répertoriées par le JCTLM.**

*Les méthodes de référence utilisent toutes une approche par dilution isotopique. Les étapes d'hydrolyse des esters de cholestérol et d'extraction du cholestérol ont toujours lieu. La principale différence est l'outil analytique qui peut être la LC/MS ou la GC/MS. La GC/MS nécessite une étape supplémentaire de dérivation.*

### 1.2.2.a. 1<sup>ère</sup> étape : le choix du cholestérol marqué

Le choix de la molécule marquée est une étape cruciale en dilution isotopique. Les molécules marquées et non marquées doivent avoir le même comportement chromatographique et le même schéma de fragmentation. En dilution isotopique, l'étalon interne correspond à l'analyte recherché marqué avec un ou plusieurs isotopes stables. Différentes études ont permis de démontrer que le marquage au  $^{13}\text{C}$  était le plus judicieux comparé notamment au marquage au deutérium. En effet, afin de développer une méthode la plus exacte possible, les composés marqués et non-marqués doivent co-éluer. Ceci permet de minimiser l'erreur d'instabilité du spectromètre de masse en mesurant de façon simultanée l'abondance du fragment du cholestérol marqué et du cholestérol non-marqué. Cependant, en chromatographie en phase gazeuse, les composés marqués au deutérium sont partiellement ou complètement séparés des composés non-marqués. Il a été démontré qu'aucune séparation n'était observée avec des molécules marquées au carbone 13 c'est pourquoi toutes les méthodes de référence utilisent comme étalon interne du cholestérol marqué avec cet isotope stable [112, 113]. Lors du choix de la molécule marquée, il est également nécessaire de prendre en compte l'abondance naturelle des isotopes stables déjà présents dans la molécule car si elle n'est pas négligeable elle peut être à l'origine d'interférences dans les mesures. Le marquage de l'étalon en au moins deux positions permet de fortement diminuer ces interférences lorsque celui-ci est conservé durant la fragmentation. Elles sont pratiquement nulles lorsque l'étalon est marqué en trois ou quatre positions [114]. Les méthodes de référence utilisent des molécules marquées qui diffèrent par la position et le marquage (Figure 15). La méthode du NIST et celle du DGKC modifiée par Kock *et al.* utilisent le  $[25,26,27\text{-}^{13}\text{C}_3]$ cholestérol comme standard interne [113, 115–117]. Les méthodes de Ghent et du DGKC utilisent quant à elles le  $[3,4\text{-}^{13}\text{C}_2]$ cholestérol [118–120].



**Figure 15 : Les étalons internes utilisés dans les méthodes de référence pour le dosage du cholestérol.**

*1.2.2.b. 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> étapes : l'hydrolyse des esters de cholestérol et l'extraction du cholestérol total*

Après avoir ajouté la molécule marquée, l'échantillon subit une réaction d'hydrolyse qui permet de libérer le cholestérol estérifié. Pour cela une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) alcoolique concentrée est utilisée. La concentration en KOH et l'alcool utilisé varient selon les méthodes de référence (Tableau 8). Le KOH peut être dilué dans de l'éthanol [112, 116, 121] ou du méthanol [119, 120]. Les conditions d'hydrolyse peuvent varier en durée (de 30 minutes à 3 heures) et en température (de 37 °C à 70 °C). Après la réaction, des solutions d'eau et d'hexane sont ajoutées et le cholestérol total est extrait en isolant la phase supérieure organique.

Méthodes de référence	Solutions d'hydrolyse	Conditions d'hydrolyse
<b>NIST</b>	KOH à 8,9 mol/L + 4 mL éthanol	3 h à 37°C
<b>Ghent</b>	KOH méthanolique à 1 mol/L	90 min à 70°C
<b>DGKC (Siekman)</b>	KOH éthanolique	30 min à 55°C
<b>DGKC modifiée (Kock)</b>	KOH aqueux à 8,9 mol/L + 1 mL éthanol	3 h à 50°C

**Tableau 8 : Comparaison des conditions d'hydrolyse.**

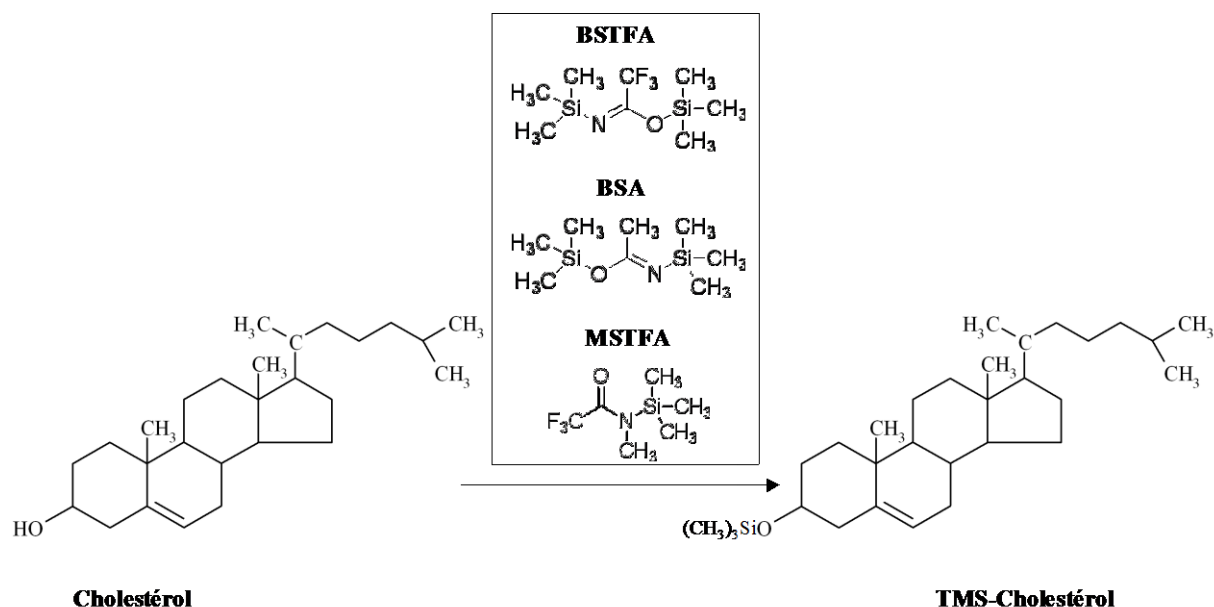
*Les méthodes de référence réalisent une hydrolyse avec du KOH qui peut être éthanolique (8,9 mol/L) ou méthanolique (1 mol/L). La durée et la température de réaction varient de 30 minutes à 3 heures et de 37 à 70 °C.*

Plus récemment, Edwards *et collaborateurs* ont développé une méthode de référence qui montre l'importance de cette étape d'hydrolyse. La principale différence entre cette méthode et celles développées précédemment est la dilution du sérum dans une solution tampon contenant un détergent, le Triton X100, permettant de faciliter l'hydrolyse des esters de cholestérol. [111].

*1.2.2.c. 4<sup>ème</sup> étape : la dérivation*

Après avoir extrait le cholestérol présent dans l'échantillon une étape de dérivation est nécessaire afin de réaliser des analyses par chromatographie en phase gazeuse. En effet, les composés injectés doivent être volatils et thermiquement stables. L'étape de dérivation masque les groupements hydrophiles de la molécule. Les méthodes de référence utilisent toutes le cholestérol dérivé sous forme de triméthylsilyl-cholestérol (TMS-cholestérol). Cette étape consiste à ajouter un

groupement triméthyl-silyl sur l'hydroxyle présent sur le carbone 3. Pour cela plusieurs agents de dérivation peuvent être utilisés, comme le N,O-bis(TMS)acétamide (BSA) [112], N,O-bis(TMS)trifluoroacétamide (BSTFA) [117, 118, 122] ou bien le N-TMS-N-méthyltrifluoroacétamide (MSTFA) [116, 119–121] (Figure 16).



**Figure 16 : La réaction de dérivation du cholestérol.**

*Toutes les méthodes de référence utilisent une réaction de triméthyl-silylation pouvant utiliser du N,O,-bis(TMS)acétamide (BSA), du N,O-bis(TMS)trifluoroacétamide (BSTFA) ou du N-TMS-N-méthyltrifluoroacétamide (MSTFA).*

Ces différents réactifs sont utilisés dans les méthodes de référence actuellement validées. Il existe de très légères différences entre ces derniers. Le BSTFA réagit plus rapidement quand il est utilisé avec du TMCS comme catalyseur, le BSA est plus stable et le MSTFA est plus volatil. Cependant comme expliqué précédemment, le cholestérol dérivé obtenu aura la même structure, seules les conditions de dérivation, comme la température et la durée de réaction varient. Des variations du protocole de dérivation sont aussi observées entre différentes méthodes de référence utilisant le même réactif de dérivation. Ces différences sont répertoriées dans le Tableau 9.

Méthodes de référence	Réactifs de dérivation	Conditions de dérivation
<b>NIST</b>	bis(TMS)acétamide (BSA)	30 min à t°ambiante
<b>Ghent</b>	N-TMS-N-méthyltrifluoroacétamide (MSTFA)	15 min à 90°C
<b>DGKC (Siekmann)</b>	N-TMS-N-méthyltrifluoroacétamide (MSTFA)	20 min à 70°C
<b>DGKC modifiée (Kock)</b>	MSTFA/pyridine (1/2)	30 min à 60°C

**Tableau 9 : Comparaison des conditions de dérivation entre les différentes méthodes de référence.**

*Les méthodes de référence n'utilisent pas les mêmes réactifs de dérivation (BSA, MSTFA) et de la pyridine peut éventuellement être ajoutée. Les durées et températures de réaction varient elles aussi.*

#### 1.2.2.d. 5<sup>ème</sup> étape : l'analyse par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse

Les méthodes de référence pour le dosage du cholestérol peuvent utiliser deux types de chromatographies couplées à la spectrométrie de masse : la chromatographie en phase liquide ou en phase gazeuse. Leurs performances sont comparables. Cependant chacune de ces méthodes possède un avantage important. L'utilisation de la chromatographie liquide dans la méthode de référence mise au point par Wolff Briche *et al.* en 2002 permet d'éviter l'étape de dérivation entraînant une durée d'analyse plus courte [117]. Cependant, la chromatographie en phase gazeuse est plus robuste que la chromatographie en phase liquide. Par ailleurs, elle est utilisée dans la majorité des méthodes de référence, soit les méthodes du NIST [113], de Ghent [119, 120] et du DGKC [116, 121].

La mise au point de nouvelles méthodes est toujours d'actualité comme démontré par l'article publié par Edwards *et collaborateurs* en 2011 [111]. Un des avantages de cette méthode est qu'elle ne nécessite pas de pré-dosage. En effet, les méthodes précédentes utilisent l'« *Exact matching isotope dilution* » où les quantités de molécules marquées et non-marquées présentes dans l'échantillon sont identiques [123]. Par conséquent, il est nécessaire de réaliser un pré-dosage afin d'estimer la concentration de l'analyte dans l'échantillon et d'ajouter ensuite la même quantité de molécule marquée. Dans la publication d'Edwards *et collaborateurs* la concentration en cholestérol est déterminée grâce à l'utilisation d'une régression linéaire dite « multi-niveaux ». Dans ce cas, la quantité de cholestérol non-marqué présent dans les différentes solutions étalons est croissante et permet de couvrir toute la gamme de concentration pouvant être rencontrée. Tous les échantillons, quel que soit leur niveau de concentration, pourront dans ce cas être quantifiés sans réaliser de dosage préliminaire.

Cette publication a aussi démontré l'absence d'interférence avec différents composés via l'analyse d'échantillons de sérum dans lesquels ont été ajoutés un mélange de sept stérols correspondant à des stérols végétaux et des précurseurs présents dans la voie de biosynthèse du cholestérol. Après avoir sélectionné les ions spécifiques à chacun de ces stérols, le mélange est ajouté à l'échantillon de sérum. La comparaison des concentrations en cholestérol obtenues en présence et en absence du mélange des sept stérols permet de conclure sur la présence ou non d'interférences. Il a été démontré que les sept stérols utilisés avaient un temps de rétention différent de celui du cholestérol. De plus, aucune différence significative de concentration n'a été observée en présence et en absence du mélange démontrant qu'aucun de ces stérols n'interféraient avec la méthode développée [111].

## **2. Méthodes de dosage du LDL-cholestérol**

Actuellement, la quasi-totalité des méthodes et matériaux de référence permettant d'assurer la traçabilité et la fiabilité des examens relatifs aux anomalies lipidiques portent sur la mesure du cholestérol total et très peu concernent le LDL-cholestérol [124]. Pourtant, les recommandations de bonne pratique relatives à la « Prise en charge thérapeutique du patient dyslipidémique » publiées en mars 2005 par l'AFSSAPS indiquent que « *le LDL-cholestérol est un meilleur indicateur du risque coronaire que le cholestérol total* » [95]. En effet, le cholestérol total est un bon prédicteur en première intention cependant il prend en compte à la fois le LDL-cholestérol qui est un facteur de risque, mais aussi le HDL-cholestérol qui est un facteur protecteur.

Les valeurs souhaitables définies par le NCEP permettant de fournir des mesures fiables de LDL-cholestérol correspondaient à une erreur totale maximale de 12 % obtenue à partir d'un biais et d'un coefficient de variation de 4 % [125, 126].

Différentes approches peuvent être utilisées par les laboratoires de biologie médicale afin de déterminer la concentration en LDL-cholestérol. La plus répandue utilise l'équation de Friedewald [127], cependant de nouvelles méthodes dites « directes » ont vu le jour ces 15 dernières années.

### **2.1. Méthodes utilisées par les laboratoires de biologie médicale**

Dans 87 % des cas, la concentration en LDL-cholestérol est calculée indirectement par l'utilisation de l'équation de Friedewald [127]. Cependant cette formule n'est pas applicable pour des concentrations en triglycérides supérieures à 3,88 mmol/L [128].

Les techniques de dosage entièrement automatisées également appelées « techniques homogènes » sont utilisées par 13 % des laboratoires de biologie médicale.

### 2.1.1. Calcul du LDL-cholestérol par l'équation de Friedewald

Ce calcul suppose que le cholestérol total est distribué dans trois classes majeures de lipoprotéines : les VLDL, les HDL et les LDL. Il repose les mesures de concentrations sériques de cholestérol total, triglycérides et HDL-cholestérol afin de déterminer la concentration en LDL-cholestérol en utilisant l'équation suivante :

$$\begin{aligned}\text{LDL-C (mmol/L)} &= \text{CT} - \text{HDL-C} - \text{TG}/2,2 \\ \text{LDL-C (g/L)} &= \text{CT} - \text{HDL-C} - \text{TG}/5\end{aligned}$$

Le rapport TG/5 ou TG/2,2 est une estimation de la concentration en VLDL-cholestérol lorsque la concentration est exprimée respectivement en g/L ou en mmol/L. Chez les individus normolipidémiques, le rapport de concentration entre les triglycérides et le cholestérol au sein des VLDL est en moyenne de 5/1. La concentration en LDL-cholestérol estimée par cette équation prend également en compte la contribution du cholestérol associé aux IDL et à la Lp(a) qui sont, avec les LDL, les lipoprotéines les plus athérogènes.

L'utilisation de cette équation possède cependant un certain nombre de limitations. Premièrement, elle cumule les incertitudes de mesure du cholestérol total, des triglycérides et du HDL-cholestérol. Deuxièmement, elle ne peut pas être utilisée lorsque la concentration en triglycérides est supérieure à 3,88 mmol/L ou avec des échantillons dont la concentration en chylomicrons est importante, comme par exemple dans les échantillons de patients non à jeun. Ces échantillons ont alors une fraction de VLDL contenant plus de triglycérides que la normale, soit un rapport TG/cholestérol pouvant atteindre 15/1 ou plus. Dans l'équation de Friedewald, le rapport TG/5 (ou TG/2,22) ne donne donc pas une estimation suffisamment juste de la concentration en cholestérol associé à cette fraction de lipoprotéine. Dans ce cas, la concentration en VLDL-cholestérol est surestimée, ce qui entraîne une sous-estimation de la concentration en LDL-cholestérol.

Cette équation ne peut également pas être utilisée chez les patients atteints d'hyperlipoprotéinémie de type III, qui se traduit par une concentration importante de  $\beta$ -VLDL. Dans ce cas, le rapport de concentration entre les triglycérides et le cholestérol contenus dans la fraction de VLDL est de 3/1 ou moins. Ceci est dû à la présence de  $\beta$ -VLDL et du fait que leur concentration en cholestérol est plus importante que celle des VLDL. L'utilisation de l'équation de Friedewald sous-estime alors la concentration en cholestérol dans la fraction de VLDL et par conséquent surestime le LDL-cholestérol.

Dans la majorité des cas, les échantillons ont une concentration en triglycérides suffisamment basse pour permettre l'utilisation de l'équation de Friedewald. Cependant les laboratoires de biologie médicale se retrouvent quotidiennement dans l'impossibilité de rendre un résultat de LDL-



cholestérol calculé par la formule de Friedewald chez un à plusieurs patients en raison d'une triglycémie trop élevée.

C'est pourquoi de nouvelles méthodes de dosage du LDL-cholestérol dites « directes » ont vu le jour depuis la fin des années 90. Ces méthodes permettent d'obtenir des incertitudes de mesure plus faibles que celles obtenues avec l'équation de Friedewald, qui cumule celles obtenues pour les 3 paramètres pris en compte dans le calcul. Elles évitent également la présence d'interférences liées à des concentrations importantes en triglycérides.

### 2.1.2. Les méthodes dites « directes »

Le NCEP conseille de mesurer le LDL-cholestérol de façon directe afin de ne pas rencontrer les différentes limitations observées avec l'équation de Friedewald et exposées dans le chapitre précédent. Afin de répondre à ce besoin des méthodes de première, deuxième puis troisième génération ont été développées.

#### *2.1.2.a. Les méthodes de première génération : la précipitation chimique*

La première méthode directe mise au point est une méthode de précipitation sélective des LDL grâce à l'ajout de différents composés chimiques qui peuvent être de l'héparine à pH 5,12, du polyvinylsulfate, un polymère amphiphatique non spécifique ou encore du sulfate de dextran.

Après la réaction de précipitation des LDL, le surnageant et le précipité sont séparés par une étape de centrifugation. La concentration de LDL-cholestérol peut ensuite être déterminée de deux façons différentes. Elle peut être calculée indirectement en soustrayant la concentration en cholestérol mesurée dans le surnageant après la centrifugation à celle mesurée avant cette étape. Elle peut également être mesurée directement dans le précipité après l'avoir resuspendu.

Cependant, ces procédures n'ont pas montré d'avantages appréciables en termes de précision, justesse ou spécificité en comparaison avec l'équation de Friedewald. De plus, un grand nombre d'interférences ont été identifiées. Premièrement, les acides gras libres dont la concentration est supérieure à 2 mmol/L interfèrent négativement avec la précipitation par le sulfate de dextran et le polyvinylsulfate conduisant à une surestimation de la concentration en LDL-cholestérol. Deuxièmement, une concentration en triglycérides supérieure à 3,88 mmol/L interfère avec toutes les méthodes de précipitation de la même manière que pour l'équation de Friedewald en entraînant une sous-estimation de la concentration en LDL-cholestérol. Pour finir, une partie des VLDL précipitent avec les LDL quel que soit le type de précipitation utilisé [129, 130].

Du fait de ces nombreuses limitations des méthodes de deuxième génération ont vu le jour, visant à améliorer les méthodes de précipitation.

### 2.1.2.b. Les méthodes de deuxième génération : l'immuno-séparation

La méthode de deuxième génération a été mise au point en 1994 par les sociétés Genzyme Diagnostics et Sigma Diagnostics. Il s'agit d'une méthode d'immuno-séparation dont le principe consiste à éliminer toutes les lipoprotéines qui ne sont pas des LDL par une étape de pré-traitement manuel. Le LDL-cholestérol est ensuite mesuré directement dans le surnageant à l'aide de kits de dosage enzymatique après une filtration sur membrane [131, 132]. Pour ce faire, cette méthode utilise des anticorps polyclonaux fixés sur des billes de latex. Ces anticorps sont dirigés contre l'apolipoprotéine A-I présente sur les HDL et l'apolipoprotéine E présente sur les chylomicrons, les VLDL et les IDL.

Différentes études ont été réalisées afin de comparer cette méthode à la méthode de référence qui est la  $\beta$ -quantification et dont le principe est développé dans la suite de ce manuscrit. L'étude réalisée en 1996 par Pisani *et collaborateurs* n'a pas montré de différence significative entre la méthode de référence et la méthode de Genzyme Corporation avec un coefficient de corrélation de 0,98. Elle démontre cependant que des traces de VLDL sont détectées dans les LDL pour des échantillons de patients hypertriglycéridémiques. Il est important de noter que, dans la méthode de référence, le mesurande correspond au cholestérol associé aux LDL et à la Lp(a). Dans cette technique par immunoséparation, après la précipitation il ne restait que 75 % de la Lp(a) initialement présente dans l'échantillon. De plus, contrairement à l'équation de Friedewald, aucune IDL n'était présente dans l'échantillon ce qui entraîne une sous-estimation de la concentration en cholestérol [131].

Différents facteurs pouvant influencer sur les résultats ont été identifiés. Le premier est la congélation qui entraînerait une agrégation des LDL et par conséquent une sous-estimation de la concentration en LDL-cholestérol proportionnelle à la durée de congélation. Pisani et McNamara ont démontré que la concentration en LDL-cholestérol pouvait être diminuée jusqu'à -12 % après 3 mois de conservation à -70 °C puis se stabilisait [131, 133].

L'étude réalisée par McNamara a démontré qu'une hypercholestérolémie entraîne un biais négatif de -5,8 % par rapport à la  $\beta$ -quantification alors que l'hypertriglycéridémie engendre un biais positif de 12,2 % [133]. Ces résultats sont confirmés par ceux obtenus par Maitra *et collaborateurs* en 1997. Le biais obtenu par comparaison à la méthode de référence pour des concentrations en triglycérides supérieures à 4,54 mmol/L est de 12,5%. Cette étude a aussi démontré qu'un biais de -14% était observé chez des patients atteints d'hyperlipoprotéïnémie de type III [134].

La principale limitation étant l'étape manuelle, des méthodes de troisième génération automatisées ont été développées à partir de 1998.

### *2.1.2.c. Les méthodes de troisième génération : les analyses homogènes*

Il existe actuellement différentes méthodes de troisième génération qui peuvent être séparées en 2 groupes principaux, les méthodes utilisant des détergents et les méthodes à la catalase. Parmi les laboratoires de biologie médicale, 10 % utilisent les méthodes avec détergents et 3,6 % utilisent les méthodes avec la catalase [135, 136]. Ces différentes méthodes utilisent des réactifs pouvant contenir différents tensioactifs, polymères ioniques ainsi que d'autres composés chimiques qui permettent un blocage spécifique ou une solubilisation des différentes classes de lipoprotéines afin de mesurer spécifiquement le cholestérol associé aux LDL par techniques enzymatiques.

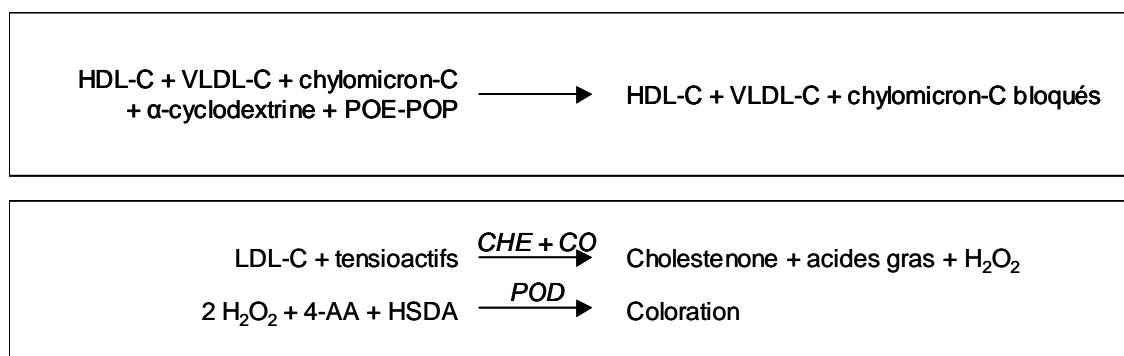
#### ➤ Les méthodes utilisant des détergents

Le principe général de ces méthodes consiste à bloquer les lipoprotéines autres que les LDL. Seul le cholestérol associé aux LDL sera dosé par une réaction enzymatique.

Les différentes méthodes développées ci-après à titre d'exemple correspondent à des adaptations des techniques développées par Kyowa et Seikis.

#### **Exemple 1 : Solubilisation du LDL-cholestérol (« SOL », Kyowa)**

Cette méthode utilise deux réactifs différents (Figure 17). Le premier contient du  $MgCl_2$ , un colorant, un tampon à pH 6,75 et du sulfate d' $\alpha$ -cyclodextrine. Le sulfate d' $\alpha$ -cyclodextrine, qui possède une activité mimant celle de l'héparine, a une forte charge négative, ce qui permet de masquer le cholestérol des chylomicrons et des VLDL en présence d'ions magnésium. Pour cela il forme des complexes avec ces différentes lipoprotéines solubles dans l'eau et résistants aux réactions enzymatiques. Le deuxième réactif contient les enzymes cholestérol oxydase, cholestérol estérase et peroxydase, un chromogène, un tampon à pH 6,75 et un complexe polyéther polyoxyéthylène-polyoxypropylène (POE-POP) qui bloque le cholestérol lié aux HDL. La sélectivité pour le LDL-cholestérol dépend de la masse moléculaire du bloc POP (optimale à 3850 Da) et de l'index d'hydrophobicité (90%). Le chromogène est mesuré par spectrophotométrie à 600 nm [137].



**Figure 17 : Principe de la méthode homogène « SOL ».**

*La première réaction permet de masquer le cholestérol des lipoprotéines autres que les LDL. La deuxième réaction consiste à doser le cholestérol associé aux LDL grâce aux enzymes cholestérol estérase (CHE), cholestérol oxydase (CO) et peroxydase (POD). (POE-POP : polyéther polyoxyéthylène-polyoxypropylène, HSDA : N-(2-hydroxy-3sulfopropyl)-3,5-diméthoxyaniline, 4-AA : 4-aminoantipyrène.)*

Dans les publications de Nauck *et al* [138] et Estaban-Salan *et al* [139], les coefficients de variation obtenus avec cette méthode étaient compris entre 0,7 et 3,1 % ce qui répond aux critères de 3% du NCEP. La méthode, linéaire jusqu'à 10,6 mmol/L, avait pour limite de détection 0,005 mmol/L. Concernant la spécificité de la méthode, 52 à 64 % des IDL, 16 % des VLDL et 18 % des HDL (riches en apoE) étaient retrouvés dans la fraction de LDL. En comparaison avec la méthode de référence, cette méthode entraînait un biais négatif de 5 %.

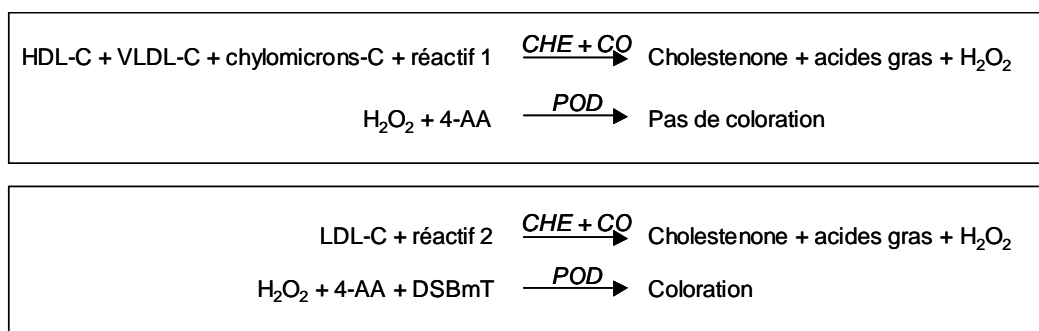
Différents composés pouvant entraîner des interférences ont été identifiés. C'est le cas de l'hémoglobine, qui entraînait un biais positif d'environ 10 % à 6 000 mg/L et de la bilirubine non conjuguée à 500 mg/L et conjuguée à 250 mg/L qui diminuaient la concentration en LDL-cholestérol de 5 %. Les interférences étaient négligeables pour les acides biliaires à des concentrations inférieures à 200 µmol/L.

Les avantages de cette méthode sont l'absence de précipitation, la durée de l'analyse relativement courte (une dizaine de minutes) et le faible volume de sérum nécessaire (quelques µL). Pour finir, il a été démontré que cette méthode avait des biais plus faibles par rapport à la méthode de référence que l'équation de Friedewald pour les patients non à jeun ou avec une concentration en triglycérides supérieure à 4,56 mmol/L [138, 139].

## Exemple 2 : Utilisation de tensioactifs (« SUR », Sekisui)

Cette méthode utilise deux réactifs (Figure 18). Le premier contient de l'acide ascorbique oxydase, du 4-aminoantipyrène, de la peroxydase, de la cholestérol oxydase, de la cholestérol estérase, dans un tampon à pH 6,3 ainsi qu'un détergent spécifique qui a pour rôle de solubiliser toutes les lipoprotéines autres que les LDL. Le cholestérol associé à ces lipoprotéines réagit alors avec les enzymes cholestérol estérase et cholestérol oxydase, générant du peroxyde d'hydrogène qui est consommé par une peroxydase en présence de 4-aminoantipyrène sans générer de coloration. Le deuxième réactif est ensuite ajouté. Il contient du disodium de N,N-bis-(4-sulfobutyl)-*m*-toluidine, du tampon à pH 6,3 et un détergent spécifique qui libère le cholestérol lié aux LDL. Une réaction similaire à celle décrite précédemment a lieu. La présence de disodium de N,N-bis-(4-sulfobutyl)-*m*-toluidine (DSBmT) entraîne une coloration de la solution mesurée par spectrophotométrie à 546 nm. L'absorbance sera proportionnelle à la concentration en LDL-cholestérol de l'échantillon.

Dans la publication de Nauck *et al* [136], la fidélité intermédiaire observée correspondait à un coefficient de variation inférieur ou égal à 3 %. La méthode, linéaire jusqu'à 25,8 mmol/L, avait une limite de détection de 0,01 mmol/L. Concernant la spécificité, dans la fraction isolée contenait 87 % de LDL, 31 à 47 % d'IDL et 19 % de VLDL. Les biais mesurés contre la méthode de référence allaient de -3,9 à -5,1 % et l'erreur totale était inférieures aux valeurs fixées par le NCEP (<12 %).



**Figure 18 : Principe de la méthode homogène « SUR ».**

*Le premier réactif dégrade spécifiquement le cholestérol associé aux lipoprotéines autres que les LDL sans qu'il y ait de coloration. Le deuxième réactif dégrade le LDL-cholestérol en présence de DSBmT. La coloration de la solution sera proportionnelle à la quantité de LDL-cholestérol (CHE : cholestérol estérase, CO : cholestérol oxydase, POD : peroxydase, DSBmT : disodium N,N-bis(4-sulfobutyl)-*m*-toluidine, 4-AA : 4-aminoantipyrène)*

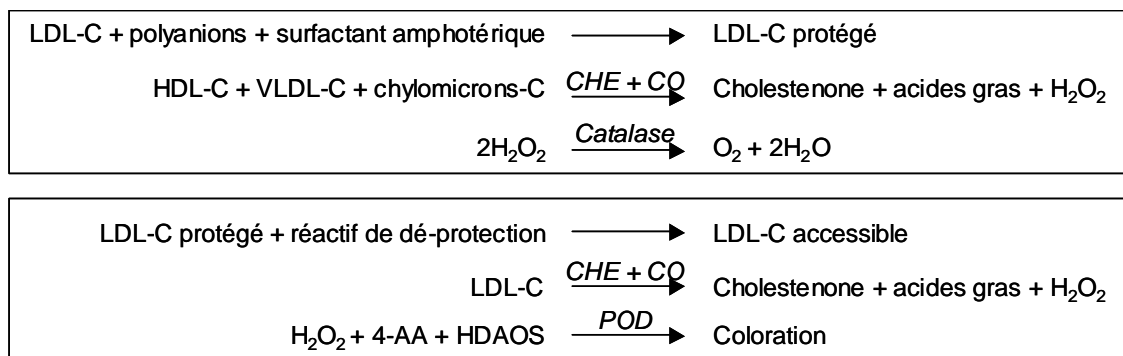
Des interférences ont été observées dans les échantillons ayant une concentration en triglycérides supérieure à 10,34 mmol/L. L'ajout d'une concentration de bilirubine allant jusqu'à 258 mg/L n'entraînait pas de diminution de la concentration en LDL-cholestérol de plus de 5 % [140]. Une concentration en acide ascorbique inférieure à 150 mg/L n'altérait pas les résultats. Des effets non significatifs ont été observés pour des concentrations en bilirubine inférieures à 400 mg/L et des concentrations en acides biliaires inférieures à 200  $\mu$ mol/L [140, 141]. Seulement 60 % des patients ayant une concentration en triglycérides comprise entre 3,35 et 4,13 mmol/L ou supérieure à 4,13 mmol/L étaient correctement classés [140].

#### ➤ Les méthodes avec catalase

Ces méthodes ont pour principe de dégrader dans un premier temps le cholestérol associé aux lipoprotéines autres que les LDL. L'utilisation d'une catalase permet de dégrader le peroxyde d'hydrogène formé lors de cette réaction. Dans un second temps, seul le LDL-cholestérol subit les différentes réactions enzymatiques permettant un dosage spécifique. Les différentes méthodes développées ci-après à titre d'exemple correspondent à des adaptations des techniques développées par Wako et Denka.

#### **Exemple 1 : Utilisation de polyanions et d'une catalase (« PRO », Wako)**

Cette méthode repose sur l'utilisation de deux réactifs différents (Figure 19). Le premier est composé d'un tampon à pH 6,8 (composé de N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-diméthoxyaniline et NaCl), de cholestérol estérase, cholestérol oxydase, catalase, polyanions et d'un agent tensioactif amphotérique qui protège sélectivement les LDL des réactions enzymatiques. Le cholestérol des lipoprotéines autres que les LDL réagit avec la cholestérol estérase et la cholestérol oxydase produisant du peroxyde d'hydrogène consommé par la catalase. Le deuxième réactif contient du tampon à pH 7,0, du 4-aminoantipyrène, de la peroxydase, de l'azide de sodium et un tensioactif non-ionique qui élimine l'agent protecteur fixé sur les LDL et permet la réaction spécifique des cholestérol estérase et oxydase avec le LDL-cholestérol. Le peroxyde d'hydrogène obtenu entraîne une coloration bleue en réagissant avec le réactif de Trinder. L'absorbance est ensuite mesurée par spectrophotométrie à 600 nm et permet de déterminer la concentration en LDL-cholestérol.



**Figure 19 : Principe de la méthode homogène « PRO ».**

*Le premier réactif protège le LDL-cholestérol et dégrade le cholestérol associé aux lipoprotéines autres que les LDL. La catalase dégrade le peroxyde formé par la cholestérol estérase (CHE) et cholestérol oxydase (CO). Le deuxième réactif rend le LDL-cholestérol accessible et le dégrade. La réaction avec la peroxydase (POD) entraîne une coloration de l'échantillon proportionnelle à la quantité de LDL-cholestérol. (4-AA : 4-aminoantipyrène, HDAO : N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline).*

Comme indiqué dans l'article de Nauck *et al* [136], le coefficient de variation obtenu avec cette méthode était de 1,2 % et l'erreur totale était comprise entre 2,6 et 5,6 % pour des concentrations en LDL-cholestérol allant de 2,67 à 5,67 mmol/L. Cette méthode, linéaire jusqu'à 7,74 mmol/L, avait une limite de détection à 0,03 mmol/L. Le biais par rapport à la méthode de référence était de -0,4 %, mais était de -3,7 % dans le cas d'hyperlipoprotéinémie de type IIa. De plus, la concentration en LDL-cholestérol était surestimée d'environ 30 % chez les patients atteints d'hyperlipoprotéinémie de type III.

Concernant les interférences, il a été observé que la bilirubine à des concentrations inférieures à 234 mg/L ainsi que l'hémoglobine à des concentrations inférieures à 5,3 g/L n'interféraient pas significativement (<5 %) sur les résultats. Une concentration en TG supérieure à 3,42 mmol/L augmente les résultats de plus de 5 % [139].

### **Exemple 2 : Utilisation de tensioactifs et d'une catalase (« CAT », Denka)**

Tout comme la méthode de Wako, le peroxyde d'hydrogène formé par la dégradation du cholestérol associé aux lipoprotéines autres que les LDL est éliminé en réagissant avec la catalase. Seul le cholestérol associé aux LDL entraîne une coloration de la solution. La sélectivité de la méthode est permise grâce à l'utilisation de 2 agents tensioactifs non ioniques. Ces 2 agents appelés « Emulgen 66 » (polyoxyéthylène) et « Emulgen 90 » se trouvent avec un rapport

Aucune interférence n'a été observée avec des concentrations en bilirubine inférieures à 300 mg/L, en hémoglobine inférieures à 5000 mg/L, en acide ascorbique inférieures à 500 mg/L ou avec des acides gras (5 % huile de germe de soja). Cependant une importante concentration en triglycérides entraîne quant à elle des interférences. En effet, le coefficient de corrélation observé en comparant la méthode de Denka à la méthode de référence est de 0,96 pour des concentrations normales en triglycérides mais est seulement de 0,86 pour des concentrations en triglycérides supérieures à 4,52 mmol/L [142, 143].





Méthodes	réactifs	Gamme dynamique	% LDL mesurées	Biais (%)	CV (%)	interférences		
						TG	HDL	IDL
<b>SOL</b> "Kyowa"	$\alpha$ -cyclodextrine + POE-POP	0,005 - 10,6 mmol/L	ND	- 5 %	0,7 à 3,1 %	NON	17,8 % retrouvées (riche apoE)	52-64 % retrouvées
<b>SUR</b> "Sekisui"	2 tensio-actifs	0,01 - 25,8 mmol/L	87%	-3,9 à -5,1 %	< 3,1 %	10 % à partir de 8 mmol/L	NON	31-47 % retrouvées
<b>PRO</b> "Wako"	polyanion + catalase	0,03 - 7,7 mmol/L	ND	- 0,4 %	< 1,2 %	10 % à partir de 8 mmol/L	ND	30 % retrouvées
<b>CAT</b> "Denka-seiken"	Tensioactifs + catalase	0,18 - 14,2 mmol/L	95%	- 4,9 %	< 1,8 %	10 % à partir de 8 mmol/L	ND	31 % retrouvées

**Tableau 10 : Tableau récapitulatif des méthodes directes homogènes les plus utilisées.**

(ND : non déterminé)

### ➤ Conclusion

Les performances observées pour ces méthodes « homogènes » sont résumées dans le Tableau 10. Leur principal avantage est l'automatisation complète du dosage du LDL-cholestérol a comme conséquence une augmentation de la précision concernant le pipetage et un contrôle plus précis de la durée et de la température de réaction [136, 137].

Une étude réalisée par Miller *et collaborateur* en 2010 a comparé ces différentes méthodes à la méthode de référence et le biais observé était compris entre -6,8 et +1,1 % pour des échantillons de patients normolipidémiques. Ce biais peut être en partie expliqué par le fait que la mesure du LDL-cholestérol n'est pas faite dans la même matrice pour la mesure de référence et la mesure directe. En effet, dans la méthode de référence, le LDL-cholestérol est mesuré dans le surnageant après une étape d'ultracentrifugation et de précipitation. Concernant les méthodes directes, le LDL-cholestérol est mesuré directement dans le sérum [144].

En conclusion, pour des patients normolipidémiques, la majorité de ces différentes méthodes répondent aux recommandations instaurées par le NCEP en terme d'erreur totale exceptée la méthode de Denka avec une erreur totale de 13,5 %. Bien que la fidélité intermédiaire de ces méthodes soit meilleure que celle obtenue avec l'équation de Friedewald, avec des CV deux à trois fois plus faibles, les biais observés par rapport à la méthode de référence peuvent atteindre plus de 12 % [144, 145]. Cependant, les méthodes directes donnent des résultats fiables pour des triglycéridémies allant de 4 g/L à un seuil généralement supérieur à 7 g/L et technique dépendant. Au contraire, les biais négatifs obtenus avec l'équation de Friedewald peuvent être supérieurs à 10

% à partir d'une concentration en triglycérides de 2 g/L [146, 147]. Il semblerait que les techniques directes permettent une meilleure appréciation du risque cardiovasculaire chez les patients diabétiques dont la concentration en triglycérides est supérieure à 2 g/L. En effet, dans l'étude organisée par Hirany *et collaborateur*, les biais obtenus avec la méthode directe sur des échantillons de patients diabétiques étaient inférieurs à 1 %, alors que sur les mêmes échantillons les biais obtenus avec l'équation de Friedewald étaient d'environ 8 % [148].

Concernant les patients atteints de troubles lipidiques, toutes ces méthodes fournissent des résultats très largement biaisés comparés à la méthode de référence avec des erreurs totales comprises entre -25,9 % et 31,9 %. La principale cause de cette augmentation de l'erreur totale est la non spécificité de la méthode en présence de lipoprotéines anormales, telles que les  $\beta$ -VLDL, dans les échantillons de patients malades [144]. Une étude complémentaire réalisée par Schaefer *et collaborateurs* a comparé les méthodes directes développées par Kyowa à la méthode par précipitation au sulfate de dextran en présence de magnésium. Les résultats montrent des biais de -2 % pour les sujets sains et de -7 % pour les sujets atteints de maladies cardiovasculaires. Ces résultats ont permis de conclure que pour des patients dyslipidémiques la méthode de dosage indirect du LDL-cholestérol par précipitation permettait une meilleure estimation que les méthodes directes [149].

## 2.2. Méthode de référence : la $\beta$ -quantification

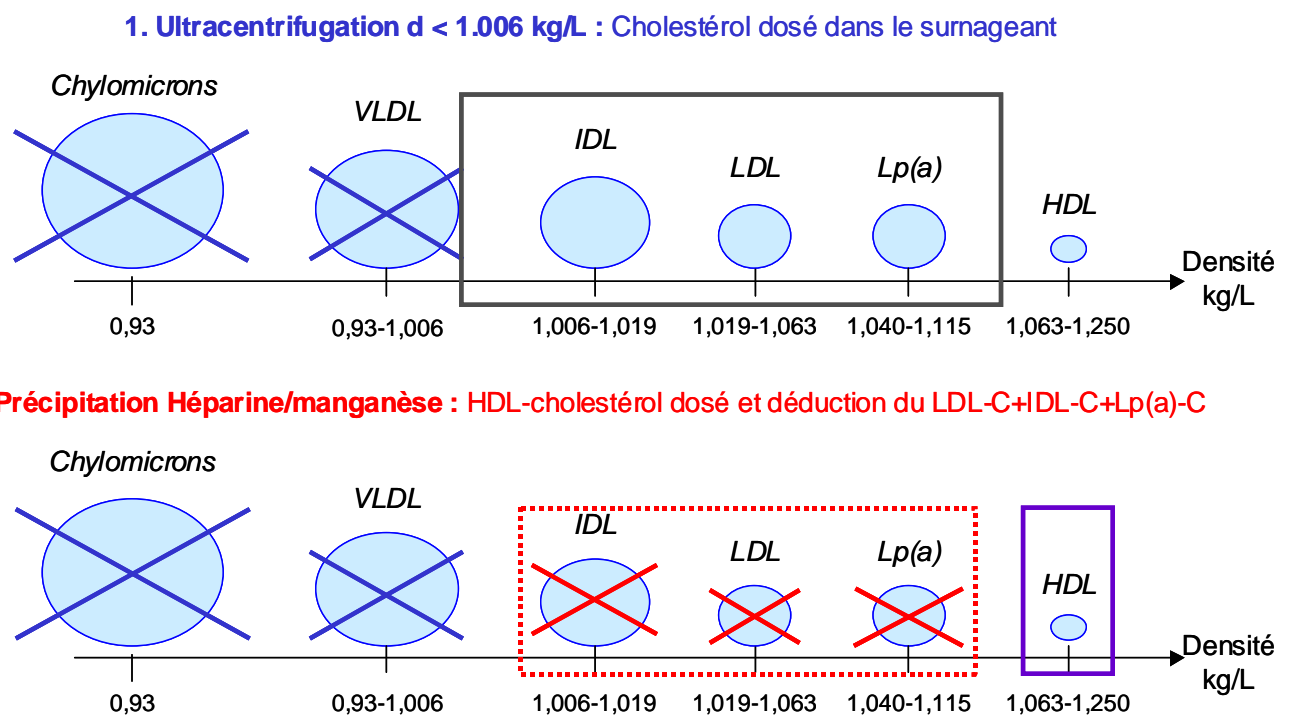
A l'heure actuelle il n'existe qu'une seule méthode de référence répertoriée par le JCTLM pour le dosage du LDL-cholestérol. Il s'agit de la  $\beta$ -quantification [150] (Tableau 11). Cette méthode utilise des techniques d'ultracentrifugation et de précipitation.

<b>Ultracentrifugation/spectrophotometry method for LDL cholesterol in blood serum</b> • CDC beta-quantification reference method for LDL cholesterol in serum, (extension of CDC HDL cholesterol method)	
<b>Applicable matrice(s)</b>	fresh, or frozen serum
<b>Full description of technique(s)</b>	Ultracentrifugation removes VLDL, $d < 1.006$ , preventing interference (TG) with the heparin/Mn <sup>2+</sup> precipitation step for removal of non-HDL. HDLC quantitation is spectrophotometric.
<b>Quantity</b>	Amount-of-substance concentration
<b>Applicable range</b>	1.3 mmol/l to 9.7 mmol/l
<b>Expected uncertainty</b>	1.3 % to 1 %
<b>Reference(s)</b>	In: Handbook of Lipoprotein Testing, 2nd Edition. Washington DC: AACC Press 2001: 227-230.
<b>Comment(s)</b>	The expanded uncertainty is relative
<b>JCTLM DB identification number</b>	CYC_II_L_I_RMP_05

**Tableau 11 : Méthode de référence répertoriée par le JCTLM pour le dosage du LDL-cholestérol.**

Cette méthode de référence peut être décomposée en deux étapes (Figure 21). La première étape consiste à éliminer les VLDL et les chylomicrons de l'échantillon de sérum grâce à une ultracentrifugation à une densité de 1,006 kg/L pendant 18 heures à 105 000 g. Les chylomicrons et VLDL, dont la densité est comprise entre 0,93 et 1,006 kg/L, forment une couche et sont prélevés afin d'être éliminés de l'échantillon. La concentration en cholestérol est ensuite mesurée dans le sous-nageant qui contient les HDL, LDL, IDL et la Lp(a).

Un mélange d'héparine et de chlorure de manganèse est ensuite ajouté au sous-nageant afin de précipiter sélectivement toutes les lipoprotéines contenant l'apolipoprotéine B100, soit les LDL, les IDL et la Lp(a). La concentration en LDL-cholestérol est ensuite calculée comme étant la différence entre la concentration en cholestérol dans le sous-nageant avant et après l'étape de précipitation.



**Figure 21 : Principe de la  $\beta$ -quantification.**

*Les chylomicrons et les VLDL sont éliminés par ultracentrifugation puis des LDL sont précipitées. La concentration en LDL-cholestérol est déduite des concentrations en cholestérol mesurée après ces différentes étapes.*

La fraction de LDL-cholestérol isolée par  $\beta$ -quantification contient donc également du IDL-cholestérol et Lp(a)-cholestérol. Chez des individus normolipidémiques, les IDL ne contribuent qu'à environ 1,5 % de la mesure du LDL-cholestérol. Cependant leur concentration peut être considérablement augmentée chez certains patients ayant des concentrations importantes en triglycérides.

La Lp(a) contribue en moyenne à environ 0,08 à 0,1 mmol/L du LDL-cholestérol mesuré. Cependant, la concentration en Lp(a) est très variable d'un individu à un autre. Sa contribution a été estimée à 7 % de la concentration en LDL-cholestérol chez des patients ayant une concentration en LDL-cholestérol de 3,37 mmol/L et une concentration en Lp(a) de 30 mg/dL [126]. Des estimations plus précises de la concentration en LDL-cholestérol peuvent être faites en corrigeant la contribution du Lp(a)-cholestérol et du IDL-cholestérol. Cependant, du fait de l'athérogénicité de ces lipoprotéines, corriger leur contribution pourrait diminuer la sensibilité de la mesure du LDL-cholestérol en tant qu'indicateur du risque cardiovasculaire. En effet, les patients ayant un risque important de développer des maladies coronariennes peuvent avoir des concentrations importantes en IDL-cholestérol et Lp(a)-cholestérol. Une correction de ces concentrations pourrait entraîner une erreur de diagnostic chez certains patients car leur concentration en LDL-cholestérol serait inférieure à la valeur seuil. C'est dans ce contexte que le NCEP recommande de ne pas corriger la contribution de la Lp(a) pour les mesures de LDL-cholestérol [126].

### **3. Méthodes de dosage du HDL-cholestérol**

Bien que la prise de décision pour une intervention médicamenteuse dépende de la concentration en LDL-cholestérol, la valeur seuil pour ce paramètre varie en fonction du nombre de facteurs de risque cardiovasculaire supplémentaires présents chez le patient, parmi lesquels figure le HDL-cholestérol (cf. Chapitre II.2.). Les directives publiées par le NCEP en 1993 reconnaissent le HDL-cholestérol comme un facteur de risque indépendant du LDL-cholestérol et recommandent de mesurer le HDL-cholestérol dès le premier dépistage [151]. En 2002, la valeur seuil à partir de laquelle le HDL-cholestérol est considéré comme étant un facteur de risque a été élevée par le NCEP de 0,9 mmol/L à 1,0 mmol/L [152]. En France, l'ANSM a actualisé en 2005 ses recommandations de bonne pratique intitulées « Prise en charge thérapeutique du patient dyslipidémique » [95]. Ces recommandations indiquent qu'une concentration en HDL inférieure à 1,0 mmol/L est considérée comme un facteur majeur de risque de développer des maladies cardiovasculaires. Inversement, une concentration supérieure à 1,5 mmol/L est considérée comme un facteur protecteur.

Afin de disposer de valeurs les plus fiables possibles le NCEP fixe à 13 % l'erreur totale maximale obtenue pour des concentrations en HDL-cholestérol supérieures à 1,09 mmol/L. Cette valeur correspond à un biais inférieur à 5% et d'un coefficient de variation inférieur à 4 % Lorsque la concentration est inférieure à 1,09 mmol/L la valeur de l'écart-type admissible est de 0,04 mmol/L [125, 126].

### **3.1. Méthodes utilisées par les laboratoires de biologie médicale**

Dans les laboratoires de biologie médicale, les techniques de dosage utilisées pour mesurer le HDL-cholestérol peuvent être séparées en deux groupes : les techniques par précipitation sélective et les techniques homogènes. Bien que très utilisées dans les années 90, les approches de précipitation ont depuis été largement remplacées par les techniques homogènes entièrement automatisées [153]. En effet, en 2012 en France, 12% des laboratoires utilisaient la technique de précipitation contre 88% pour les techniques homogènes.

#### **3.1.1. Techniques de précipitation sélective des lipoprotéines**

Les techniques de précipitation chimique sélective ont été rapportées pour la première fois dans la littérature par Burstein et Samaille en 1960 [154]. Le principe consiste à précipiter sélectivement les VLDL et LDL dans des échantillons de sérum et de plasma grâce à l'utilisation d'un mélange de polyanions et de cations divalents ou d'autres réactifs. Ce mélange va agréger sélectivement les lipoprotéines contenant une apoB et les rendre insolubles. Elles seront ensuite sédimentées par une étape de centrifugation et seules les HDL présentes en solution pourront être prélevées et le cholestérol associé dosé.

En France, les laboratoires de biologie médicale utilisent exclusivement du phosphotungstate de magnésium comme mélange de précipitation. Ce qui différencie les deux groupes de pairs utilisant cette approche est le mode de détection : 87% des laboratoires utilisent la spectroréflexométrie et 13% la spectrophotométrie.

Cette technique, ne nécessitant pas d'équipements spéciaux et utilisant des réactifs couramment utilisés en laboratoire et peu coûteux, est relativement peu onéreuse. Sa principale limitation est le fait que l'étape de séparation soit faite manuellement, entraînant entre autre des CV importants.

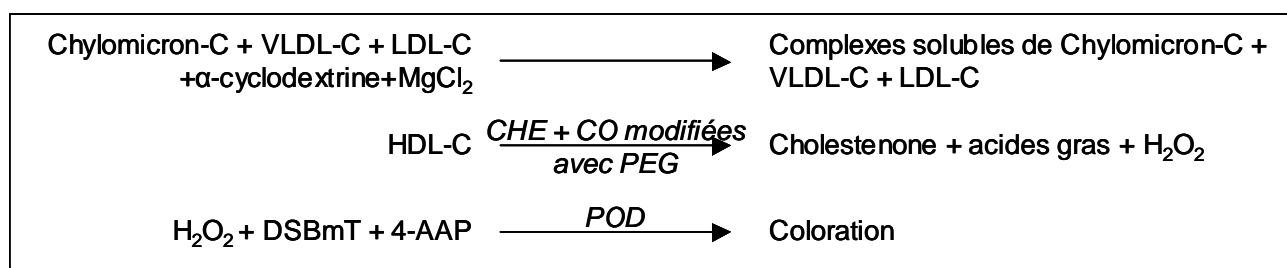
Afin d'éviter les étapes de pipetage et de manipulations manuelles, des nouvelles méthodes entièrement automatisées ont vu le jour.

### 3.1.2. Méthodes homogènes

#### 3.1.2.a. Principe des méthodes homogènes

Les méthodes directes, également appelées « homogènes » ont vu le jour pour la première fois en 1994 [155]. Tout comme pour le LDL-cholestérol, ces techniques sont entièrement automatisées. Ces méthodes peuvent être divisées selon leur principe en 5 sous-groupes.

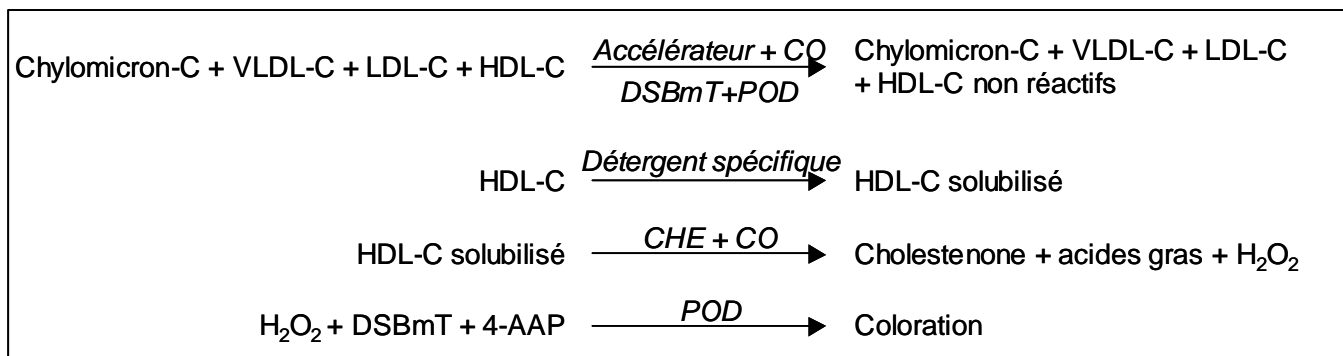
La méthode regroupant le plus grand nombre d'utilisateurs (47%) utilise des enzymes modifiées avec du polyéthylène glycol (PEG) (Figure 22) [156]. Cette méthode utilise une association d' $\alpha$ -cyclodextrines et d'ions magnésium  $Mg^{2+}$  qui bloquent sélectivement les chylomicrons, VLDL et LDL sans les précipiter. La spécificité des enzymes cholestérol oxydase et cholestérol estérase pour le HDL-cholestérol est ensuite renforcée par la liaison covalente du PEG sur ces enzymes les empêchant d'accéder au cholestérol présent au sein des lipoprotéines contenant une apoB. Le peroxyde d'hydrogène formé réagit ensuite avec la 4-aminoantipyrine et le DSBmT en présence de peroxydase (POD) et entraîne une coloration [157].



**Figure 22 : Principe de la méthode utilisant les enzymes modifiées avec du PEG .**

*L' $\alpha$ -cyclodextrine forme des complexes avec les VLDL et les chylomicrons. Les enzymes cholestérol estérase (CHE) et cholestérol oxydase (CO) modifiées au PEG réagissent spécifiquement avec le HDL-cholestérol.*

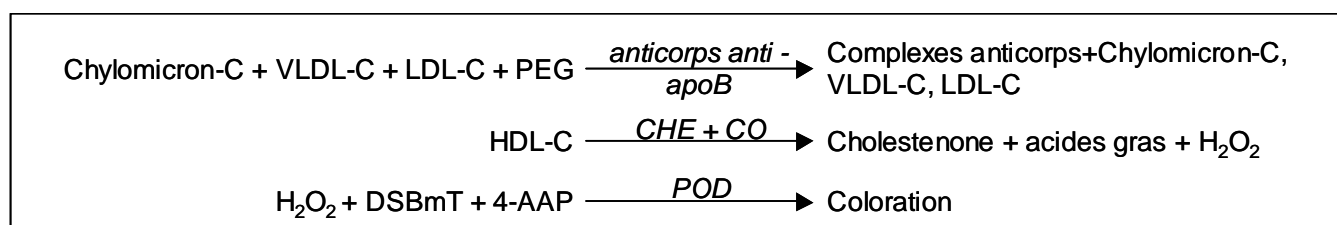
Dans le deuxième type de méthode homogène, utilisée par 15 % des laboratoires de biologie médicale, le premier réactif contient un accélérateur de la réaction provoquée par la cholestérol oxydase (CO) qui réagit avec le cholestérol associé aux chylomicrons, VLDL et LDL (Figure 23). Le peroxyde d'hydrogène formé réagit ensuite avec le DSBmT en présence de peroxydase et donne une solution incolore. Dans un deuxième temps, les HDL sont solubilisées par un détergent spécifique leur permettant de réagir avec la cholestérol estérase et la cholestérol oxydase. La présence de peroxydase entraîne la coloration de la solution.



**Figure 23 : Principe de la méthode utilisant un mélange d'accélérateur et de détergent spécifique.**

*Le mélange accélérateur/cholestérol oxydase (CO) réagit avec les chylomicrons-C, VLDL-C et LDL-C. Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formé réagit avec la peroxydase (POD) et le N, N-bis (4-sulphobutyl)-m-toluidine-disodium (DSBmT) pour donner une solution incolore. Le HDL-C est solubilisé par un détergent spécifique et dégradé par les enzymes CHE, CO et POD pour donner une solution colorée.*

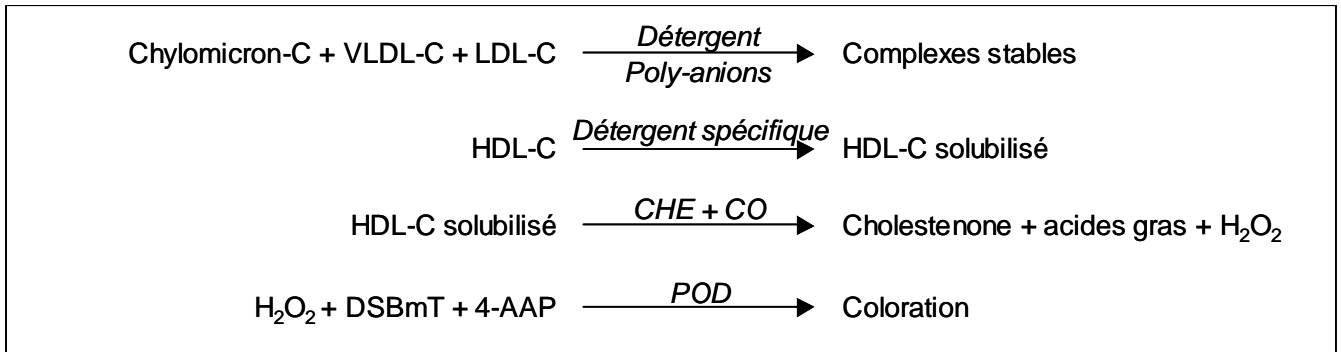
La troisième méthode, utilisée par 11% des laboratoires, a pour principe une immuno-inhibition des lipoprotéines contenant une apolipoprotéine B (Figure 24). Pour ce faire, le réactif utilisé contient des anticorps dirigés contre les apolipoprotéines B humaines contenues dans les chylomicrons, VLDL, IDL et LDL. Les complexes antigène-anticorps formés ne réagissent pas avec les enzymes cholestérol estérase et cholestérol oxydase. Seul le HDL-cholestérol réagira sélectivement avec ces enzymes et le peroxyde d'hydrogène formé entraînera une coloration de la solution après avoir réagi avec la peroxydase (POD) et le chromogène.



**Figure 24 : Principe de la méthode d'immuno-inhibition .**

*Les anticorps anti-apoB réagissent avec les chylomicrons, VLDL et LDL. Seul le HDL-C est accessible aux enzymes CHE, CO et POD, ce qui entraîne une coloration de la solution proportionnelle à la quantité de HDL-cholestérol.*

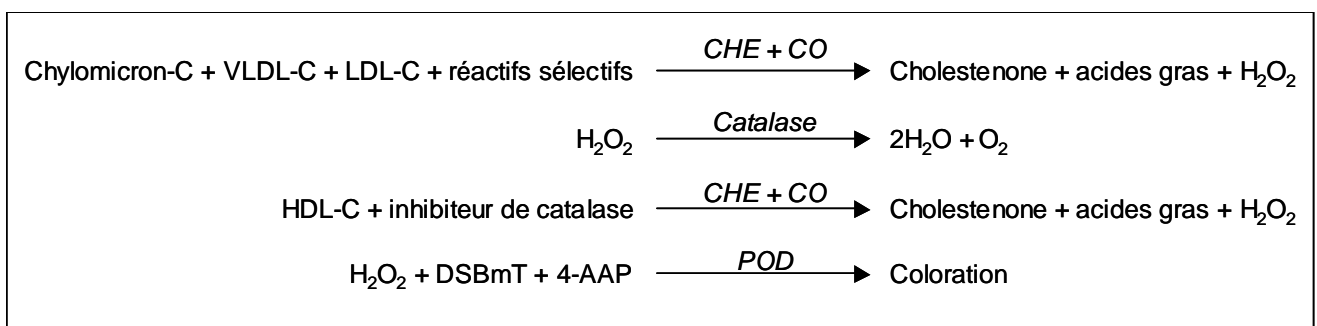
9% des laboratoires de biologie médicale utilise la méthode homogène associant des poly-anions et des détergents (Figure 25). Les poly-anions forment des complexes stables avec les chylomicrons, VLDL, IDL et LDL inhibant leur réactivité avec les enzymes. Seul le HDL-cholestérol solubilisé par un détergent réagit avec la cholestérol estérase et oxydase afin de donner une solution colorée.



**Figure 25 : Principe de la méthode utilisant un mélange de poly-anions et de détergents.**

*Le mélange de détergent et poly-anions forme des complexes stables et seul le HDL-C est solubilisé par des détergents spécifiques et réagit avec les enzymes CHE, CO et POD afin de donner une solution dont la coloration est proportionnelle à la quantité de HDL-cholestérol.*

Pour finir, la dernière méthode homogène utilise un réactif contenant une catalase (Figure 26). Le premier réactif permet aux enzymes de réagir sélectivement avec les chylomicrons-C, VLDL-C et LDL-C. Le peroxyde d'hydrogène formé est dégradé par la catalase. Le deuxième réactif, contenant un inhibiteur de catalase ainsi que la cholestérol estérase et la cholestérol oxydase, réagit spécifiquement avec le HDL-cholestérol.



**Figure 26 : Principe de la méthode utilisant une catalase .**

*La catalase réagit avec le produit de réaction des chylomicrons-C, VLDL-C et le LDL-C avec les enzymes CO et CHE. L'ajout d'un inhibiteur de catalase permet ensuite la réaction entre le HDL-C et les enzymes CHE, CO et POD entraînant une coloration due uniquement à la présence de cholestérol lié au HDL.*



### 3.1.2.b. Spécificité et interférences

Des études ont montré que des concentrations en triglycérides inférieures à 9 g/L et en hémoglobine inférieure à 2 g/L n'entraînaient d'interférence avec aucune de ces méthodes. La méthode utilisant le PEG n'est pas affectée par des concentrations en hémoglobine inférieures à 10 g/L. Concernant la bilirubine, aucune interférence significative n'a été observée pour des concentrations inférieures à 100 mg/L. Il a également été reporté dans la littérature que la méthode à la catalase pouvait être utilisée sur des échantillons de plasma contenant de l'EDTA ou de l'héparine, alors que l'EDTA semblait interférer avec la méthode PEG [153].

Un rapport, réalisé en 2007 par l'ANSM sur les méthodes de dosage de diagnostic *in vitro* [158], a évalué l'exactitude de 20 trousse de dosage utilisant des méthodes homogènes sur 7 échantillons de sérum humain couvrant une gamme de concentration allant de 0,56 mmol/L à 2,46 mmol/L. Les résultats obtenus démontrent que seulement 50 % des méthodes testées répondent aux critères d'erreur totale fixés par le NCEP. Parmi ces 10 méthodes, la moitié utilisent le principe d'immuno-inhibition, 3 utilisent des poly-anions et 2 utilisent des accélérateurs détergents. Au contraire, les méthodes utilisant le principe d'élimination à la catalase sont celles pour lesquelles les valeurs d'erreur totale sont le plus souvent supérieures aux critères NCEP. En effet, à titre d'exemple avec cette méthode des erreurs totales de 55,32% ou 68,39% ont été obtenues pour des concentrations en HDL-cholestérol de 0,56 mmol/L (le critère d'acceptabilité étant de 20,80%).

La publication de Miller *et collaborateurs* [144] reporte quant à elle des biais allant de -5,4 à +4,8 % chez des patients normolipidémiques et de -8,6 à +8,8 % chez des patients atteints de dyslipidémies. Les erreurs totales calculées étaient comprises entre -13,4 et +13,6 % et -19,8 et +36,3 % respectivement chez les patients normolipidémiques et dyslipidémiques.

## 3.2. Méthode de référence

Il existe une méthode de référence unique répertoriée par le JCTLM pour le dosage du HDL-cholestérol [159]. Cette méthode de référence est utilisée à la fois pour doser le HDL-cholestérol et le LDL-cholestérol et correspond à la  $\beta$ -quantification. Elle combine une étape d'ultracentrifugation et de précipitation sélective des lipoprotéines contenant des apolipoprotéines B grâce à un mélange d'héparine et de chlorure de manganèse. Le HDL-cholestérol est dosé dans le surnageant suite à l'étape de précipitation. Le principe et les limitations de cette méthode ont été précédemment détaillés dans le Chapitre III.2.2.

## 4. Méthodes de dosage des triglycérides

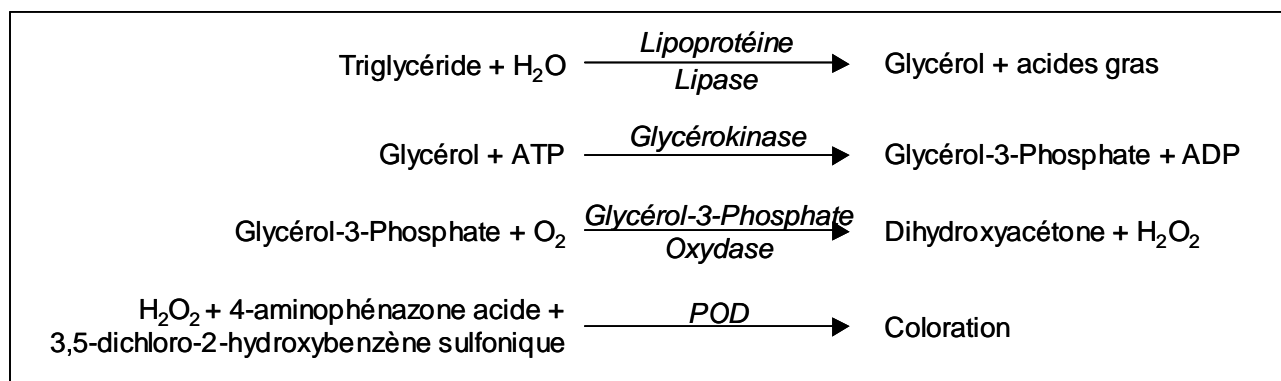
La mesure de la concentration en triglycérides dans le sérum est un paramètre important afin d'évaluer le risque de développer des maladies cardiovasculaires. En effet, les triglycérides représentent un facteur de risque indépendant dans le développement de l'athérosclérose ainsi qu'une cible thérapeutique chez les patients hypertriglycéridémiques. Leur concentration est également corrélée à une concentration accrue en LDL de faible taille pour lesquelles l'athérogénécité est la plus importante [160].

De plus, les triglycérides sont un des quatre paramètres du bilan lipidique et entrent en jeu dans la détermination de la concentration en LDL-cholestérol par l'équation de Friedewald.

Il est donc fondamental de disposer de mesures fiables de ce paramètre afin de dépister efficacement une hypertriglycéridémie et de déterminer précisément la concentration en LDL-cholestérol. Pour ce faire, le NCEP a fixé un biais maximum de 5% et un coefficient de variation inférieur ou égal à 5 % afin de disposer de valeurs les plus fiables possibles [125, 126].

### 4.1. Méthodes de dosage utilisées par les laboratoires de biologie médicale

Actuellement, les laboratoires de biologie médicale utilisent trois méthodes pour doser les triglycérides : le dosage enzymatique du glycérol total par spectrophotométrie avec et sans correction du glycérol libre ainsi que le dosage enzymatique du glycérol total par spectrorélectrométrie. Le principe général de ces méthodes est basé sur l'hydrolyse des triglycérides par des enzymes spécifiques : les lipases (Figure 27). Le glycérol alors libéré est ensuite phosphorylé par une glycérolkinase afin de former du glycérol-3-phosphate puis oxydé par une glycérol-3-phosphatase oxydase. Le peroxyde d'hydrogène formé réagit avec un chromogène phénolique et entraîne une coloration rouge de la solution dont l'intensité est directement proportionnelle à la concentration en glycérol total.



**Figure 27 : Principe de la méthode enzymatique de dosage des triglycérides.**

Les triglycérides sont hydrolysées par une lipoprotéine lipase et le glycérol ainsi libéré est dosé par colorimétrie après réaction avec une glycérokinase ainsi qu'une glycérol-3-phosphate [161].

Il est important de noter qu'en moyenne 5 à 10 % du glycérol est présent dans le sérum sous forme libre [162]. Afin de tenir compte uniquement du glycérol présent au sein des mono, di et triglycérides une méthode de dosage utilisant une correction du glycérol libre a été mise en place par Beckman Coulter. Le principe de cette dernière consiste à doser le glycérol présent dans l'échantillon avant la cascade enzymatique détaillée ci-dessus. La concentration obtenue est alors soustraite à celle obtenue après hydrolyse des triglycérides afin de déterminer la concentration en glycérol total dite « corrigée ».

Plus de 85 % des laboratoires utilisent la technique dosant le glycérol total par spectrophotométrie tandis que 13 % des laboratoires utilisent la mesure spectrorélectométrique dont le principe est développé dans le Chapitre III.1.1. Seulement 1 % des laboratoires utilisent la méthode de dosage du glycérol total « avec correction ».

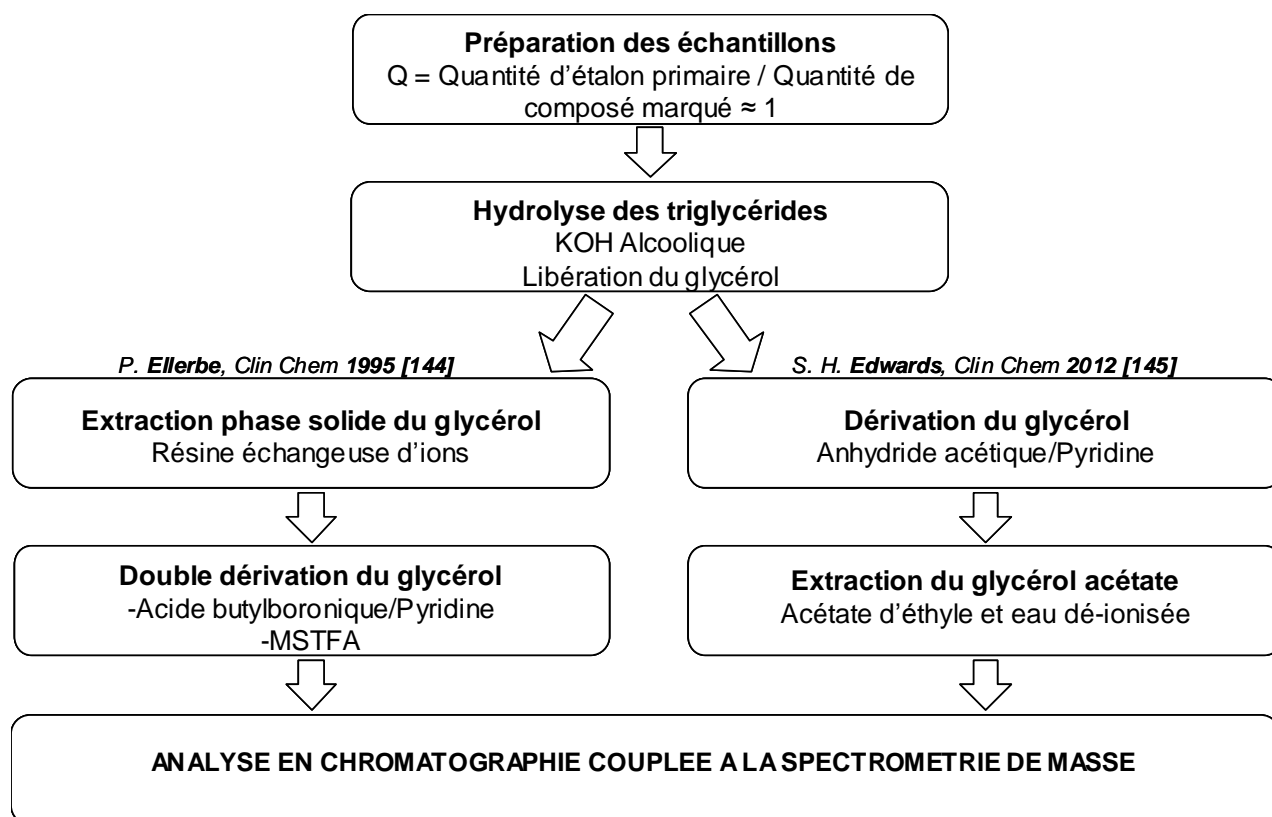
## 4.2. Méthodes de référence

Il existe actuellement deux méthodes de référence répertoriées par le JCTLM pour le dosage des triglycérides dans le sérum. Ces méthodes sont toutes les deux basées sur le principe de la ID-GC/MS appliquée au dosage du glycérol total. Les étapes de préparation des échantillons ainsi que les conditions d'hydrolyse des triglycérides sont similaires. Les principales différences entre ces deux méthodes se font au niveau des étapes d'extraction et de dérivation du glycérol. En effet, la dérivation dans le protocole d'Ellerbe *et collaborateurs* [163] se déroule en deux étapes tandis que celle d'Edwards *et collaborateurs* [164] est réalisée en une seule réaction (Figure 28).

La méthode de référence développée par le NIST [163] se divise en quatre étapes : l'hydrolyse des glycérides, l'extraction en phase solide du glycérol, la dérivation du glycérol et enfin l'analyse par GC/MS. Les étalons ainsi que les échantillons sont hydrolysés par une solution de KOH alcoolique à 0,05 mol/L pendant 2h30 à 70°C. L'hydrolysate subit ensuite une extraction en phase solide à l'aide d'une résine échangeuse d'ions puis le glycérol est dérivé par un mélange d'acide butylboronique/pyridine puis avec une solution de MSTFA avant d'être analysé par GC/MS.

La seconde méthode de référence utilisée par le CDC [164] comprend également quatre étapes qui sont l'hydrolyse des glycérides, la dérivation du glycérol, l'extraction du glycérol dérivé et enfin l'analyse par GC/MS, mais leur ordre est différent de celle développée par le NIST. Les étalons et les échantillons sont hydrolysés avec une solution d'hydroxyde de potassium alcoolique à 0,3 mol/L pendant 2h30 à 80°C afin de libérer tout le glycérol contenu dans les échantillons. L'hydrolysate est évaporé puis dérivé par un mélange anhydride acétique/pyridine (1/3 ; V/V) pendant 1 heure à 65°C afin de former du triacétate de glycérine. Le glycérol dérivé subit ensuite

une extraction liquide-liquide avec un mélange d'acétate d'éthyle/eau (2/3 ; V/V). Pour finir, la phase organique est lavée au bicarbonate de sodium (8 %) afin d'éliminer l'acide acétique formé lors de l'étape de dérivation, puis l'échantillon est analysé en GC/MS.



**Figure 28 : Principe des 2 méthodes de référence répertoriées par le JCTLM pour le dosage des triglycérides.**

*La préparation des échantillons et l'hydrolyse sont similaires entre les deux méthodes mais l'ordre des étapes d'extraction et de dérivation réalisées avant l'analyse par GC/MS est inversée.*

## **IV. Conclusion**

Afin d'assurer la traçabilité des méthodes de dosage utilisées par les laboratoires de biologie médicale pour dépister les dyslipidémies, il est important de disposer de méthode de référence mais également de matériaux de référence commutables.

Afin de répondre à ces exigences, durant ces trois années de thèse, mes travaux ont consisté à développer et/ou implémenter au laboratoire des méthodes de référence pour les biomarqueurs entrant en jeu dans le bilan lipidique, soit le cholestérol total, le HDL-cholestérol, le LDL-cholestérol ainsi que les triglycérides. Ces méthodes ont ensuite permis d'évaluer la fiabilité des méthodes de routine grâce à l'assignation de valeurs de référence à des échantillons de contrôle qualité mais également au développement d'un matériau de référence certifié pour lequel la commutabilité a été évaluée. Pour finir une nouvelle approche de correction de non commutabilité a été développée afin de permettre l'utilisation d'échantillons non-commutable pour évaluer la justesse des méthodes de routine.

## ***Partie B- PARTIE EXPERIMENTALE***



# **I. Caractérisation et validation des méthodes de référence**

Avant d'assigner des valeurs de référence à des échantillons de contrôle de la qualité il est nécessaire de disposer de méthodes de référence validées. Ce chapitre a pour but de décrire les protocoles des méthodes de référence développées au laboratoire ainsi que leur validation après une évaluation de la justesse, de la fidélité intermédiaire et des incertitudes. Les critères de justesse et de fidélité intermédiaire pour les différentes méthodes de référence validées sont renseignés dans le Tableau 12. Dans l'ensemble, ces valeurs sont deux fois plus faibles que celles fixées pour les laboratoires de biologie médicale. Les produits et équipements utilisés sont répertoriés en Annexe 2.

<b>Biomarqueurs</b>	<b>Fidélité intermédiaire</b>	<b>Justesse</b>
Cholestérol total	CV $\leq$ 1 %	Biais $\leq$ 1 %
Triglycérides	CV $\leq$ 2,5 %	Biais $\leq$ 2,5 %
HDL-cholestérol	Ecart-type $\leq$ 1 mg/dL	Biais $\leq$ 1 mg/dL
LDL-cholestérol	CV $\leq$ 2,0 %	Biais $\leq$ 1,5 %

**Tableau 12 : Critères de fidélité intermédiaire et de justesse pour les méthodes de référence [165].**

## **1.Méthode de référence pour le dosage du cholestérol total**

Cette méthode est une adaptation de celle développée par le DGKC et répertoriée par le JCTLM [121]. Elle est appliquée pour une concentration de cholestérol dans le sérum comprise entre 1 et 10 mmol/L.

### **1.1. Protocole analytique**

#### **1.1.1. Préparation des échantillons et des étalons**

La première étape dans la préparation des échantillons consiste à prélever un volume de sérum contenant environ 200 µg de cholestérol. Les volumes de sérum à prélever selon la concentration de cholestérol ont été définis afin d'éviter de prélever des volumes de sérum trop faibles, typiquement des volumes inférieurs à 25 µL, pour ne pas rencontrer de problème d'homogénéité. Il est également recommandé de prélever des volumes de sérum inférieurs à 500 µL afin de ne pas consommer trop d'échantillons, ces derniers pouvant être très coûteux. C'est notamment le cas des matériaux de référence certifié. Les volumes de sérum à prélever sont reportés dans le Tableau 13.



Concentration en cholestérol (mmol/L)	Volume de sérum à prélever (µL)
1 mmol/L	500 µL
2 mmol/L	250 µL
5 mmol/L	100 µL
6,8 mmol/L	73 µL
10 mmol/L	50 µL

**Tableau 13 : Les différents volumes de sérum à prélever en fonction de la concentration en cholestérol de l'échantillon.**

Les solutions mères de cholestérol NIST SRM 911c et de [3,4-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-cholestérol sont préalablement préparées par gravimétrie à une concentration d'environ 2,6 mmol/L dans de l'éthanol. Ces solutions mères sont utilisées pour préparer gravimétriquement 5 solutions étalons telles que le rapport entre la quantité de composé non marqué sur la quantité de composé marqué (Q) est compris entre 0,8 et 1,2. Les volumes à prélever sont présentés dans le Tableau 14. Ces 5 solutions sont ensuite évaporées puis reprises avec 5 mL de méthanol avant d'être stockées à 4°C.

	Volume de la solution de cholestérol (2,6 mmol/L)	Volume de la solution de cholestérol marqué (2,6 mmol/L)
Q ≈ 0,8	160 µL	200 µL
Q ≈ 0,9	180 µL	200 µL
Q ≈ 1,0	200 µL	200 µL
Q ≈ 1,1	220 µL	200 µL
Q ≈ 1,2	240 µL	200 µL

**Tableau 14 : Volumes respectifs des solutions mères de cholestérol et de cholestérol marqué.**

*Volumes à mélanger pour obtenir des rapports de 0,8 / 0,9 / 1,0 / 1,1 et 1,2 entre la masse de cholestérol et de cholestérol marqué dans les solutions étalons*

L'approche de dilution isotopique utilisée est l'« *exact matching isotope dilution* », qui implique que la quantité de composé marqué soit équivalente à la quantité de composé non marqué contenu dans l'échantillon à analyser (Q ≈ 1). 200 µL de la solution mère de [3,4-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-cholestérol à une

concentration de 2,6 mmol/L sont ajoutés à chaque échantillon dont le volume prélevé est décrit dans le Tableau 13. Un volume d'éthanol est ajouté au mélange de sérum et de cholestérol marqué afin d'obtenir un volume final de 5 mL.

Les solutions étalons et les solutions échantillons sont traitées de la même manière pour les étapes d'évaporation, de dérivation et d'analyse par GC/MS. Il a cependant été démontré qu'il n'était pas nécessaire de réaliser l'étape d'hydrolyse sur les solutions étalons car le cholestérol est libre à l'inverse des solutions échantillons où il est également estérifié. En effet, les résultats obtenus avec et sans hydrolyse étaient équivalents.

L'hydrolyse est effectuée sur les échantillons en ajoutant 600 µL d'une solution de KOH à 8,9 mol/L. La réaction est réalisée pendant 2 heures à 60°C sur une plaque chauffante. Le cholestérol est ensuite extrait en ajoutant 5 mL d'hexane ainsi que 5 mL d'eau. La phase organique contenant le cholestérol total est prélevée puis évaporée sous flux d'azote. La fraction est ensuite reprise dans 5 mL de méthanol et peut être conservée à 4°C pour une durée maximale de 4 mois.

Un extrait de 100 µL est ensuite prélevé dans les solutions étalons et échantillons puis évaporé sous flux d'azote, car l'étape de dérivation qui suit doit avoir lieu en l'absence totale d'eau.

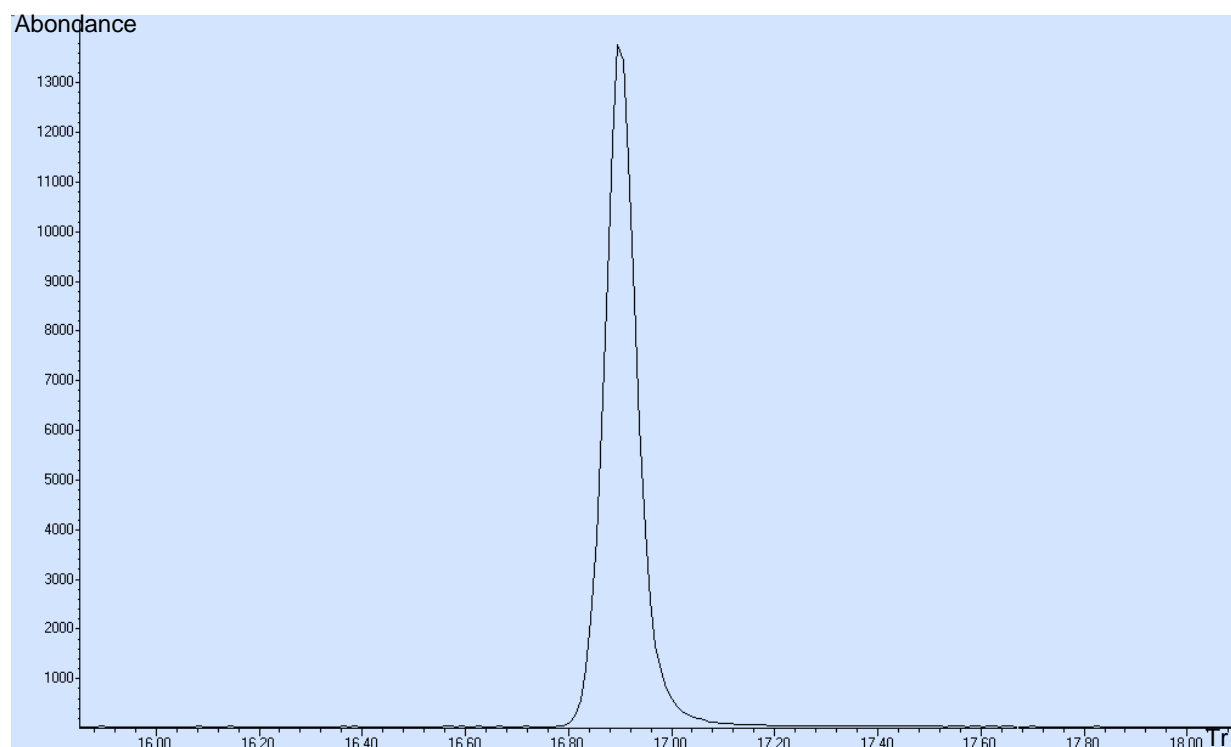
La dérivation est effectuée en ajoutant 150 µL d'un mélange MSTFA/pyridine (1/2 v/v) puis en incubant 30 minutes à 60 °C sur une plaque chauffante. Le mélange de dérivation est ensuite évaporé puis repris dans 150 µL d'hexane avant d'être injecté dans le système analytique.

### 1.1.2. Paramètres en GC/MS

Les conditions chromatographiques et de spectrométrie de masse utilisées sont reportées respectivement dans le Tableau 15 et le Tableau 16. Un exemple de chromatogramme obtenu pour un échantillon ainsi qu'un spectre de masse obtenu avec une solution de cholestérol pure de NIST 911c sont représentés en Figure 29 et Figure 30. Le temps de rétention du cholestérol dérivé est de 16,9 minutes. La méthode de quantification utilisée est réalisée en méthode SIM par dilution isotopique et est décrite en Annexe 3.

	Paramètres
Volume de la seringue	10 µL
Volume d'injection	1 µL
Température de l'injecteur	270°C
Mode d'injection	Split 20:1
Gaz vecteur	hélium
Débit gaz vecteur	1,3 mL/min
Programmation de température du four	0 min à 100°C
	20°C/min jusqu'à 280°C
	13 min à 280 °C

**Tableau 15 : Conditions chromatographiques utilisées pour l'analyse du cholestérol.**



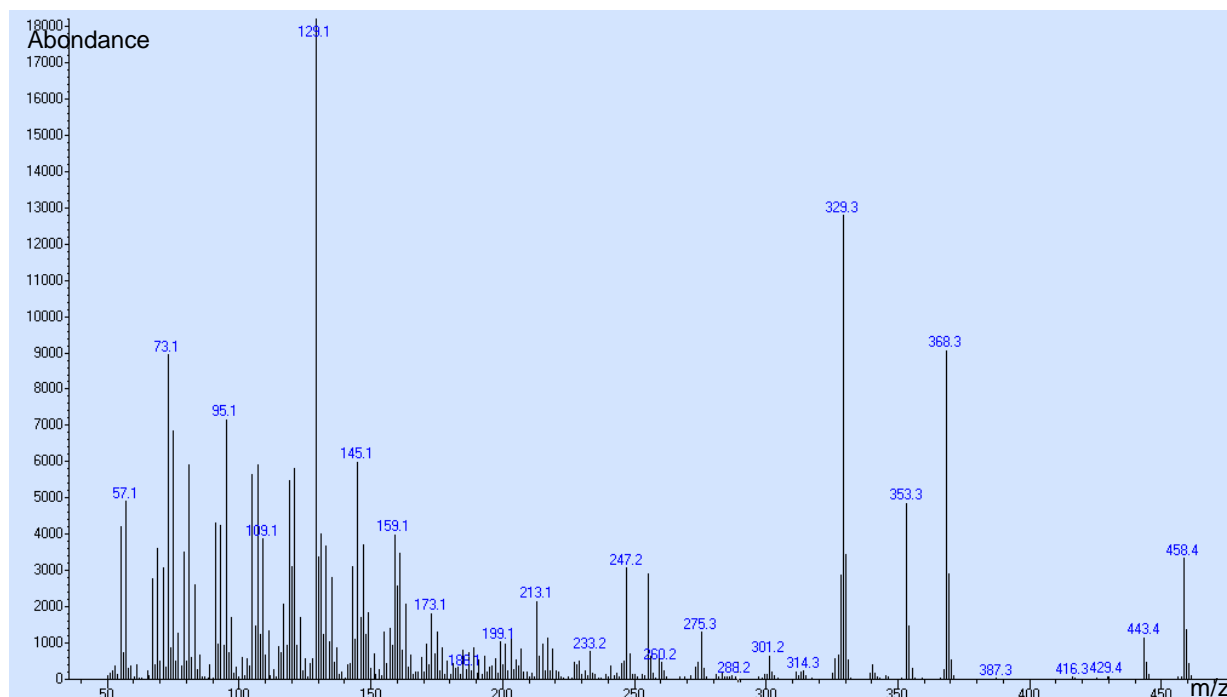
**Figure 29 : Chromatogramme en mode SIM d'une solution échantillon (NIST 1951b) contenant le cholestérol marqué.**

*L'ion caractéristique observé est l'ion 458 m/z.*

	Paramètres
Mode d'ionisation	Impact électronique
Mode d'acquisition	SIM
Température de la ligne de transfert	270°C
Température de la source	230°C
Température du quadropôle	150°C
Fréquence d'acquisition des données	20 Hz
Délai de solvant	5 min
Dwell time	50 ms
Ions de quantification	458/460*
Ions de vérification	368/370*

**Tableau 16 : Conditions en spectrométrie de masse utilisées pour l'analyse du cholestérol.**

(\*) Ions correspondant à la molécule marquée



**Figure 30 : Spectre de masse du cholestérol non-marqué NIST 911c.**

## 1.2. Evaluation de la justesse et de la fidélité

La justesse et la fidélité de la méthode de référence ont été évaluées à l'aide de matériaux de référence certifiés correspondant à des échantillons de sérum humain congelé. Les écarts normalisés ont permis de comparer la valeur déterminée expérimentalement à la valeur de référence. Lorsqu'ils sont inférieurs ou égaux à 1, ces deux valeurs ne sont pas significativement différentes. Les écarts normalisés ont été calculés à partir de l'Equation 2.

$$E_N = \left| \frac{X_{mes} - X_{ref}}{\sqrt{U_{mes}^2 + U_{ref}^2}} \right| \quad \text{Équation (2)}$$

Avec :

- $X_{ref}$  : Valeur de référence
- $X_{mes}$  : Valeur mesurée
- $U_{mes}$  : Incertitude élargie (k=2) mesurée
- $U_{ref}$  : Incertitude élargie (k=2) de référence

La justesse de la méthode de référence pour le dosage du cholestérol total a été validée à l'aide du matériau de référence certifié 1951b du NIST. Ce sérum congelé est composé de 2 niveaux de concentration en cholestérol : un niveau physiologique et un niveau pathologique. Les données de validation pour ces deux échantillons sont reportées dans la Figure 31 pour le niveau 1 et la Figure 32 pour le niveau 2. Un écart normalisé supérieur à 1 a été obtenu pour seulement une valeur (obtenue le jour 15) pour le niveau 1 et une pour le niveau 2 (obtenue le jour 11). Ces écarts normalisés, très proches de 1 et très rarement rencontrés, ont permis une meilleure estimation de la dispersion de la méthode. Nous avons décidé de conserver ces valeurs dans les données de validation.

Pour ces deux échantillons, des biais moyens de -0,42 % et +0,36 % ont été obtenus pour les niveaux 1 et 2 respectivement ainsi que des CV de 1,0 % pour le niveau 1 et de 0,7 % pour le niveau 2. Ces résultats ont répondu aux critères reportés dans le Tableau 12 qui correspondent à un biais et un CV inférieurs ou égaux à 1 % [165].

NIST 1951b - L1					
	Valeur mesurée (mmol/L)	Incertitude élargie ( $k=2$ ) (mmol/L)	Valeur de référence (mmol/L)	Incertitude élargie ( $k=2$ ) (mmol/L)	Ecart normalisé
Jour 1	4.79	0.11	4.80	0.014	0.18
	4.83	0.11	4.80	0.014	0.23
Jour 2	4.76	0.11	4.80	0.014	0.39
	4.76	0.11	4.80	0.014	0.39
Jour 3	4.75	0.10	4.80	0.014	0.50
	4.85	0.11	4.80	0.014	0.42
Jour 4	4.87	0.11	4.80	0.014	0.57
	4.76	0.11	4.80	0.014	0.41
Jour 5	4.83	0.11	4.80	0.014	0.27
	4.87	0.11	4.80	0.014	0.61
Jour 6	4.79	0.11	4.80	0.014	0.15
	4.81	0.11	4.80	0.014	0.09
Jour 7	4.72	0.10	4.80	0.014	0.76
	4.73	0.10	4.80	0.014	0.71
Jour 8	4.77	0.11	4.80	0.014	0.28
	4.82	0.11	4.80	0.014	0.12
Jour 9	4.81	0.11	4.80	0.014	0.07
	4.78	0.11	4.80	0.014	0.20
Jour 10	4.71	0.10	4.80	0.014	0.86
	4.72	0.10	4.80	0.014	0.84
Jour 11	4.81	0.11	4.80	0.014	0.06
	4.79	0.11	4.80	0.014	0.13
Jour 12	4.89	0.11	4.80	0.014	0.75
	4.80	0.11	4.80	0.014	0.07
Jour 13	4.79	0.11	4.80	0.014	0.13
	4.81	0.11	4.80	0.014	0.02
Jour 14	4.74	0.10	4.80	0.014	0.64
	4.75	0.11	4.80	0.014	0.48
Jour 15	4.69	0.10	4.80	0.014	1.06
	4.73	0.10	4.80	0.014	0.71
Moyenne	4.78				
Biais	-0.42%				
Ecart-type	0.05				
CV	1.0%				

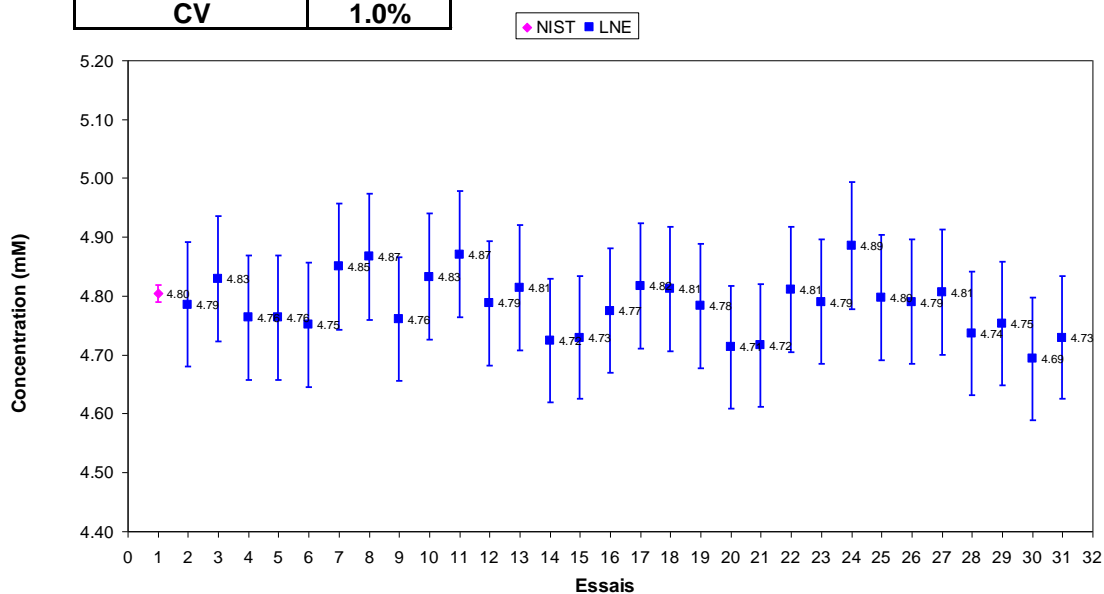


Figure 31 : Contrôle de justesse de la méthode de référence pour le dosage du cholestérol total avec le MRC NIST 1951b L1.

NIST 1951b - L2					
	Valeur mesurée (mmol/L)	Incertitude élargie ( $k=2$ ) (mmol/L)	Valeur de référence (mmol/L)	Incertitude élargie ( $k=2$ ) (mmol/L)	Ecart normalisé
Jour 1	6.95	0.11	6.90	0.022	0.51
	6.99	0.11	6.90	0.022	0.82
Jour 2	6.84	0.11	6.90	0.022	0.47
	6.94	0.11	6.90	0.022	0.38
Jour 3	6.89	0.11	6.90	0.022	0.07
	6.95	0.11	6.90	0.022	0.49
Jour 4	6.98	0.11	6.90	0.022	0.78
	6.95	0.11	6.90	0.022	0.52
Jour 5	6.92	0.11	6.90	0.022	0.23
	6.94	0.11	6.90	0.022	0.38
Jour 6	6.88	0.11	6.90	0.022	0.11
	6.89	0.11	6.90	0.022	0.07
Jour 7	6.93	0.11	6.90	0.022	0.28
	6.87	0.11	6.90	0.022	0.22
Jour 8	6.85	0.11	6.90	0.022	0.37
	6.99	0.11	6.90	0.022	0.83
Jour 9	6.91	0.11	6.90	0.022	0.13
	6.89	0.11	6.90	0.022	0.02
Jour 10	6.80	0.11	6.90	0.022	0.85
	6.85	0.11	6.90	0.022	0.36
Jour 11	6.95	0.11	6.90	0.022	0.51
	7.02	0.11	6.90	0.022	1.06
Jour 12	6.94	0.11	6.90	0.022	0.38
	6.99	0.11	6.90	0.022	0.84
Jour 13	6.91	0.11	6.90	0.022	0.14
	6.95	0.11	6.90	0.022	0.46
Jour 14	7.01	0.11	6.90	0.022	0.99
	6.79	0.11	6.90	0.022	0.92
Jour 15	6.93	0.11	6.90	0.022	0.34
	6.89	0.11	6.90	0.022	0.04
Moyenne	6.92				
Biais	0.36%				
Ecart-type	0.05				
CV	0.7%				

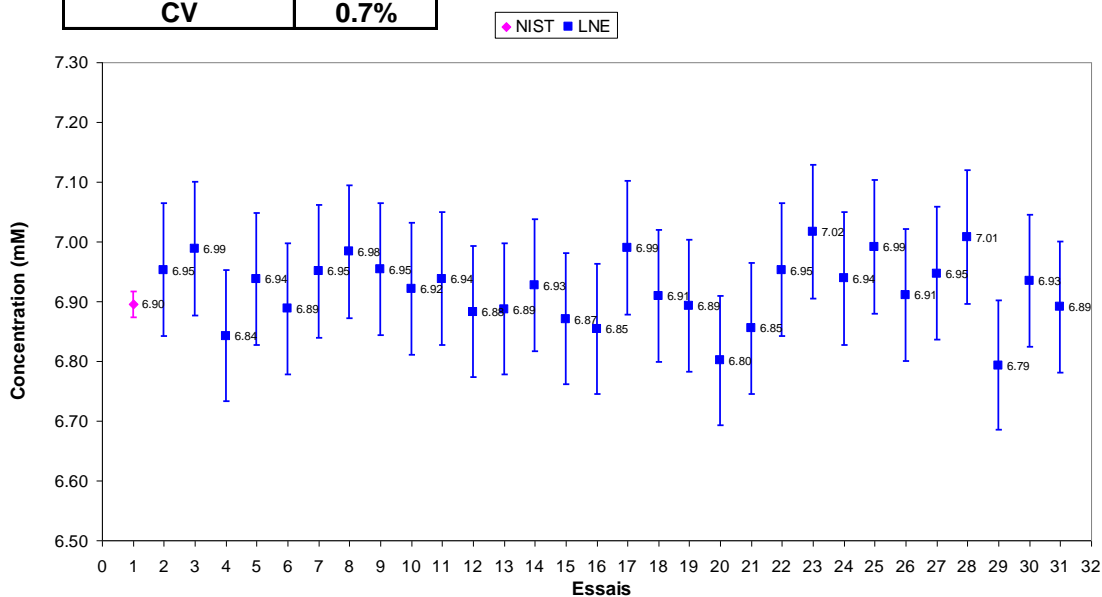


Figure 32 : Contrôle de justesse de la méthode de référence pour le dosage du cholestérol total avec le MRC NIST 1951b L2.

Ces résultats ont été confortés par la participation à deux intercomparaisons. Dans le cadre de l'intercomparaison IFCC RELA 2011, où seuls les laboratoires accrédités selon le référentiel NF EN ISO 15195 [166] sont autorisés à participer, deux échantillons de concentration différente ont été analysés. Les valeurs obtenues par le LNE étaient de  $3,997 \pm 0,075$  mmol/L pour l'échantillon 1 et  $5,092 \pm 0,058$  mmol/L pour l'échantillon 2. Les moyennes générales obtenues par l'ensemble des participants étaient de 3,960 mmol/L pour le premier échantillon et 5,081 mmol/L pour le deuxième. Les résultats obtenus n'étaient donc pas statistiquement différents de la moyenne générale.

La valeur de référence assignée par le LNE lors de l'intercomparaison CCQM K6.2, organisée uniquement entre laboratoires de référence, était de  $2,352 \pm 0,039$  mmol/L et la moyenne générale était de 2,350 mmol/L. La concentration en cholestérol total déterminée avec la méthode de référence du LNE n'était donc pas statistiquement différente de la moyenne générale obtenue à partir des résultats de tous les laboratoires participants.

En conclusion, les critères de validation fixés à 1 % en termes de biais et de CV ont été respectés par la méthode de référence du cholestérol total. De plus, les biais obtenus lors de comparaison avec nos pairs étaient très faibles.

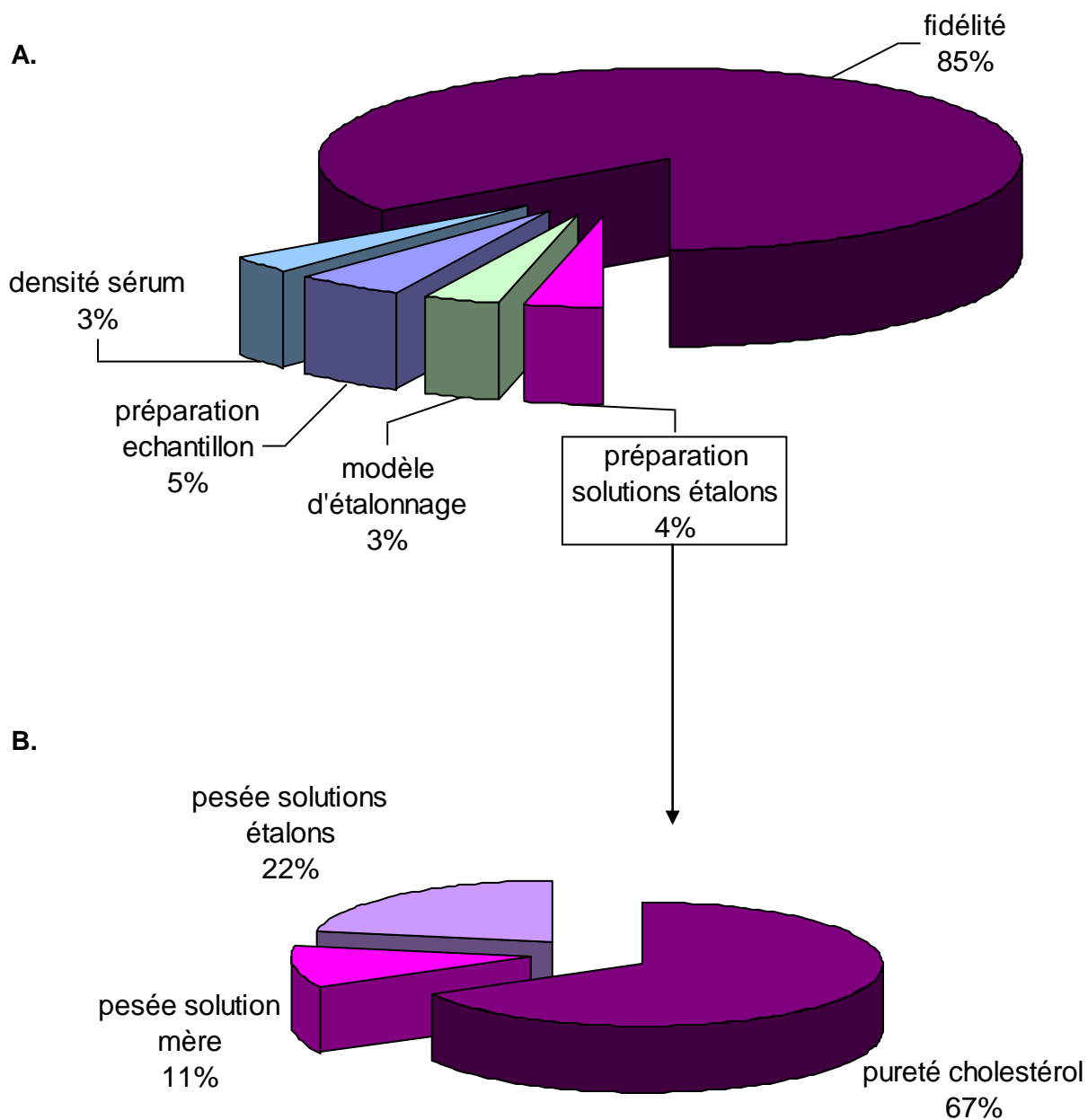
### **1.3. Estimation des incertitudes**

Une estimation du budget d'incertitude a été réalisée afin de déterminer quelles étapes de la méthode de référence étaient les principales sources d'incertitude. Le budget d'incertitude, également appelé bilan d'incertitude, est établi à partir de la « *formulation d'une incertitude de mesure et des composantes de cette incertitude, ainsi que de leur calcul et de leur combinaison* » [15].

L'incertitude a été déterminée à partir de la loi de propagation sur les paramètres intervenant dans le calcul de la concentration (ou éléments de méthode) et sur la fidélité selon la méthode préconisée par le GUM [167]. Les différentes étapes du calcul d'incertitude sont détaillées en Annexe 1.

Un exemple du budget d'incertitude de la méthode a été déterminé avec les données de validation obtenues sur le MRC 1951b de niveau 1 et est représenté dans la Figure 33. La totalité des résultats obtenus lors de la détermination de ce budget d'incertitude est présentée en Annexe 3. Les incertitudes élargies ( $k=2$ ) correspondant à ce budget étaient de 2,2 %.





**Figure 33 : Budget d'incertitude obtenu pour le cholestérol total avec l'échantillon NIST 1951b de niveau 1.**

**A. Budget global d'incertitude. B. Sources d'incertitude liées à la préparation des solutions étalons.**

La principale source d'incertitude identifiée est la fidélité de la méthode et correspond à 85 % du budget total. Cette variabilité pourrait être attribuée à une différence de rendement d'hydrolyse entre les essais se traduisant par des biais négatifs. Cependant les résultats de justesse ont démontré que dans 37 % des cas la valeur mesurée était supérieure à la valeur de référence du NIST. Ces résultats ont démontré que l'étape d'hydrolyse n'était pas la source de variabilité. Par conséquent, la fidélité de la méthode est attribuée à la différence de comportement entre les échantillons de sérum tout au long du protocole analytique. Il a également été observé une plus grande variabilité des résultats lorsque des droites d'étalonnage différentes étaient utilisées. Afin de tenir compte de cette dispersion il est nécessaire de répéter la mesure, c'est-à-dire dans ce cas réaliser trois duplicats avec trois droites d'étalonnage différentes.

La contribution importante de la fidélité est également expliquée par l'optimisation des incertitudes entraînées par les autres étapes du protocole analytique qui représentent chacune moins de 5 % du budget total. Le budget étant rapporté à 100 %, l'optimisation des étapes de préparation implique que la part de la fidélité soit prépondérante.

La deuxième source d'incertitude est la préparation des solutions échantillon et correspond à 5 % du budget total. Différentes pesées sont regroupées dans cette étape, correspondant au flacon vide, à l'ajout du sérum puis à l'ajout du cholestérol marqué. Elles ont été optimisées et le détail de la détermination de leurs incertitudes se trouve en Annexe 3.

La préparation des solutions étalons représente 4 % du budget d'incertitude. Une composante supplémentaire à la pesée a été prise en compte dans ce calcul et correspond à la pureté du cholestérol non marqué utilisé lors de la préparation de la solution mère. Sa contribution représente 67 % des incertitudes de cette étape de préparation (Figure 33.B.) mais elle ne peut cependant pas être diminuée.

La mesure de la densité du sérum est nécessaire afin de convertir la concentration en cholestérol de fraction massique à concentration molaire (mmol/L) communément utilisée par les LBM. Cette étape a dû être déterminée rigoureusement. L'optimisation de cette mesure a permis d'obtenir une proportion de 3 % du budget final ce qui est très satisfaisant.

Les incertitudes liées au modèle d'étalonnage (3 % du budget total) ont été optimisées grâce à l'utilisation de l'approche par « *exact matching isotope dilution* » et sont déterminées par la méthode des moindres carrés.

Les incertitudes rendues lors de l'analyse d'échantillons de sérum avec cette méthode de référence sont généralement comprises entre 1,5 et 2,5 %. Ces valeurs sont en accord avec les incertitudes rendues par d'autres laboratoires notamment lors d'intercomparaisons. Les données de l'intercomparaison IFCC RELA 2011 ont permis de calculer la moyenne des incertitudes obtenues par l'ensemble des participants et qui était de 1,6 %. L'incertitude moyenne obtenue lors de la CCQM K6.2 était de 1,8 %.

Dernièrement, les incertitudes fournies par le NIST dans le certificat de leur MRC ont été revues à la hausse et sont plus proches de l'estimation faite par notre laboratoire. Les incertitudes fournies

pour l'échantillon 1951b, utilisées lors de la validation de la méthode, étaient de l'ordre de 0,3 %. Celles rendues dorénavant pour le nouveau MRC 1951c sont de 1,2 %.

Pour conclure, le budget d'incertitude a permis de mettre en évidence la composante majoritaire qui est la fidélité de la méthode. Les étapes clés du protocole ont été optimisées et les résultats obtenus ont démontré que les valeurs d'incertitude obtenues étaient proches de l'état de l'art actuel.

Ces résultats ainsi que ceux obtenus pour la justesse et de fidélité intermédiaire ont permis de valider la méthode.

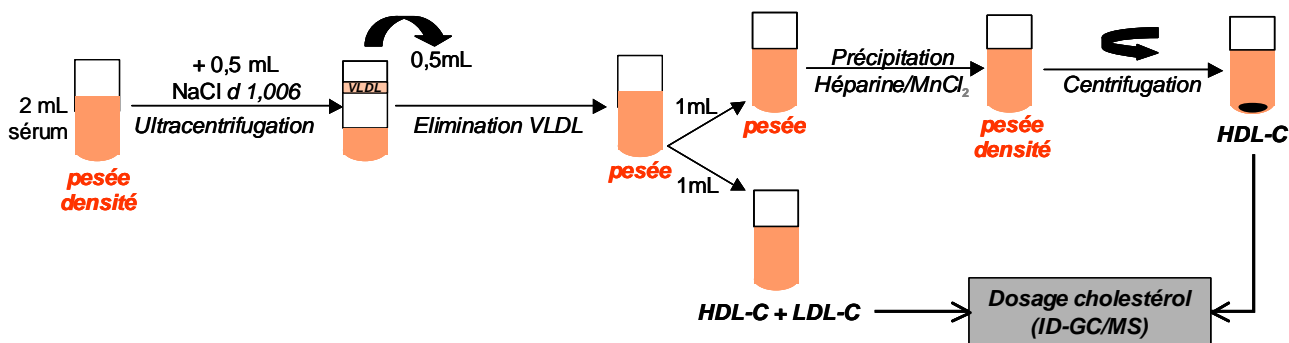
## **2. Méthode de référence pour le dosage du HDL-C et LDL-C**

### **2.1. Protocole analytique**

Comme décrit dans la partie A, la  $\beta$ -quantification permet de déterminer la concentration en HDL-cholestérol et en LDL-cholestérol. Durant les différentes étapes du protocole, tout ajout est réalisé gravimétriquement et la densité de l'échantillon est mesurée (Figure 34).

Dans un tube d'ultracentrifugation est introduit un volume de 2 mL de sérum. 500  $\mu$ L d'une solution de NaCl à 0,195 mol/L, dont la densité est de 1,006 kg/L, sont ajoutés au-dessus du sérum. L'échantillon est ensuite ultracentrifugé durant 4h30 à 540 600 g (100 000 rpm, rotor S100 AT4, Thermo Scientific) à une température de 10°C. Après ultracentrifugation, 500  $\mu$ L de la fraction flottante contenant les VLDL sont éliminés et les bords du tube sont essuyés afin d'éliminer les VLDL résiduelles. L'échantillon est homogénéisé et aliquoté en deux fractions de 1 mL. La première fraction est utilisée afin de doser le cholestérol associé aux LDL et aux HDL avec la méthode de référence par ID-GC/MS développée au laboratoire. Une étape de précipitation est réalisée sur le deuxième aliquot grâce à l'ajout de 50  $\mu$ L d'une solution de  $\text{MnCl}_2$  à 1 mol/L ainsi que 40  $\mu$ L d'une solution d'héparine (5000 U/mL). Cette étape entraîne une précipitation des lipoprotéines contenant une apoB, notamment les LDL. L'échantillon est centrifugé 30 minutes à 1500 g afin de séparer le précipité du surnageant. Le cholestérol présent dans le surnageant, correspondant au HDL-cholestérol, est ensuite dosé par la méthode de référence par ID-GC/MS.

Les volumes d'échantillon des deux fractions à prélever, correspondant au « HDL-C » et au « HDL-C+LDL-C » et permettant de disposer d'une quantité de 200  $\mu$ g de cholestérol, sont déterminés grâce au Tableau 13. Le protocole de la méthode du cholestérol total décrit dans le Chapitre I. est appliqué à ces deux échantillons afin de déterminer la concentration en cholestérol. La concentration en LDL-cholestérol est déduite de ces deux mesures en soustrayant la concentration en HDL-C à celle de la fraction « HDL-C+LDL-C ».



**Figure 34 : Protocole de la  $\beta$ -quantification.**

*L'échantillon de sérum subit une étape d'ultracentrifugation afin d'éliminer les VLDL puis une précipitation des LDL. Le cholestérol présent dans le surnageant correspond au HDL-C. La mesure du cholestérol après ces deux étapes permet de déduire la concentration en LDL-C.*

## 2.2. Evaluation de la justesse et de la fidélité

La justesse de la  $\beta$ -quantification implémentée au laboratoire a été évaluée grâce à l'analyse du MRC LNE qui correspond à un sérum congelé composé de deux niveaux de concentration. Les valeurs de HDL-cholestérol et LDL-cholestérol ont été assignées par le CDC aux Etats-Unis.

### 2.2.1. HDL-cholestérol

Les données de justesse du dosage du HDL-cholestérol sont reportées sur la Figure 35 (MRC LNE L1) et la Figure 36 (MRC LNE L2).

Les biais absolus moyens étant de +0,01 mmol/L (soit +0,38 mg/dL) pour le niveau 1 est  $-2,9 \times 10^{-4}$  mmol/L (soit -0,01 mg/dL) pour le niveau 2, ils étaient inférieurs aux critères maximum de justesse fixés à 1 mg/dL [165]. De plus, les écarts normalisés calculés sur toutes les valeurs mesurées avec les deux niveaux de concentration étaient inférieurs à 1 démontrant qu'il n'y avait pas de différence significative avec la valeur de référence fournie par le CDC.

Le critère de fidélité intermédiaire correspond à 0,03 mmol/L (soit 1 mg/dL). Les écarts-types obtenus étaient de 0,02 mmol/L (soit 0,77 mg/dL) pour le niveau 1 et de 0,03 mmol/L (soit 1 mg/dL) pour le niveau 2 et étaient donc inférieurs à ce critère [165].

Les critères de validation en termes de biais et d'écart-type ont été respectés. De la même façon que pour le cholestérol total, il serait intéressant de participer à des intercomparaisons afin de confirmer ces résultats.

MRC LNE - L1					
	Valeur mesurée (mmol/L)	Incertitude élargie ( $k=2$ ) (mmol/L)	Valeur de référence (mmol/L)	Incertitude élargie ( $k=2$ ) (mmol/L)	Ecart normalisé
Jour 1	1.28	0.038	1.28	0.037	0.02
	1.28	0.038	1.28	0.037	0.02
Jour 2	1.30	0.039	1.28	0.037	0.37
	1.30	0.039	1.28	0.037	0.31
	1.27	0.038	1.28	0.037	0.14
	1.28	0.039	1.28	0.037	0.01
Jour 3	1.28	0.039	1.28	0.037	0.01
	1.26	0.038	1.28	0.037	0.41
	1.29	0.039	1.28	0.037	0.12
	1.28	0.039	1.28	0.037	0.07
Jour 4	1.32	0.040	1.28	0.037	0.70
	1.31	0.039	1.28	0.037	0.55
	1.32	0.040	1.28	0.037	0.70
	1.31	0.039	1.28	0.037	0.54
Jour 5	1.29	0.039	1.28	0.037	0.24
	1.29	0.039	1.28	0.037	0.22
<b>Moyenne</b>	<b>1.29</b>				
<b>biais</b>	<b>0.85%</b>				
<b>Ecart-type</b>	<b>0.02</b>				
<b>CV</b>	<b>1.3%</b>				

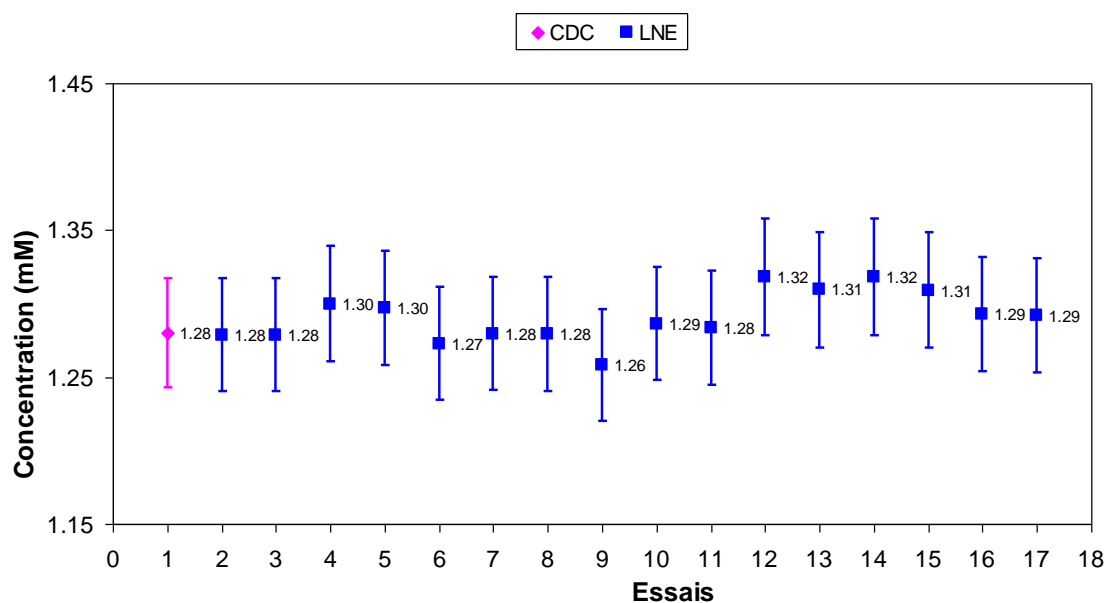


Figure 35 : Contrôle de justesse de la méthode de référence pour le dosage du HDL-cholestérol avec le MRC LNE L1.

MRC LNE - L2					
	Valeur mesurée (mmol/L)	Incertitude élargie (k=2) (mmol/L)	Valeur de référence (mmol/L)	Incertitude élargie (k=2) (mmol/L)	Ecart normalisé
Jour 1	1.49	0.061	1.53	0.047	0.50
	1.50	0.061	1.53	0.047	0.42
Jour 2	1.55	0.063	1.53	0.047	0.27
	1.54	0.063	1.53	0.047	0.10
	1.57	0.064	1.53	0.047	0.50
	1.53	0.063	1.53	0.047	0.07
	1.49	0.061	1.53	0.047	0.49
	1.48	0.061	1.53	0.047	0.56
	1.50	0.061	1.53	0.047	0.41
Jour 3	1.54	0.063	1.53	0.047	0.15
	1.56	0.064	1.53	0.047	0.37
	1.55	0.063	1.53	0.047	0.31
	1.57	0.064	1.53	0.047	0.53
Jour 4	1.53	0.062	1.53	0.047	0.02
	1.52	0.062	1.53	0.047	0.07
<b>Moyenne</b>	<b>1.53</b>				
<b>biais</b>	<b>-0.02%</b>				
<b>Ecart-type</b>	<b>0.03</b>				
<b>CV</b>	<b>1.9%</b>				

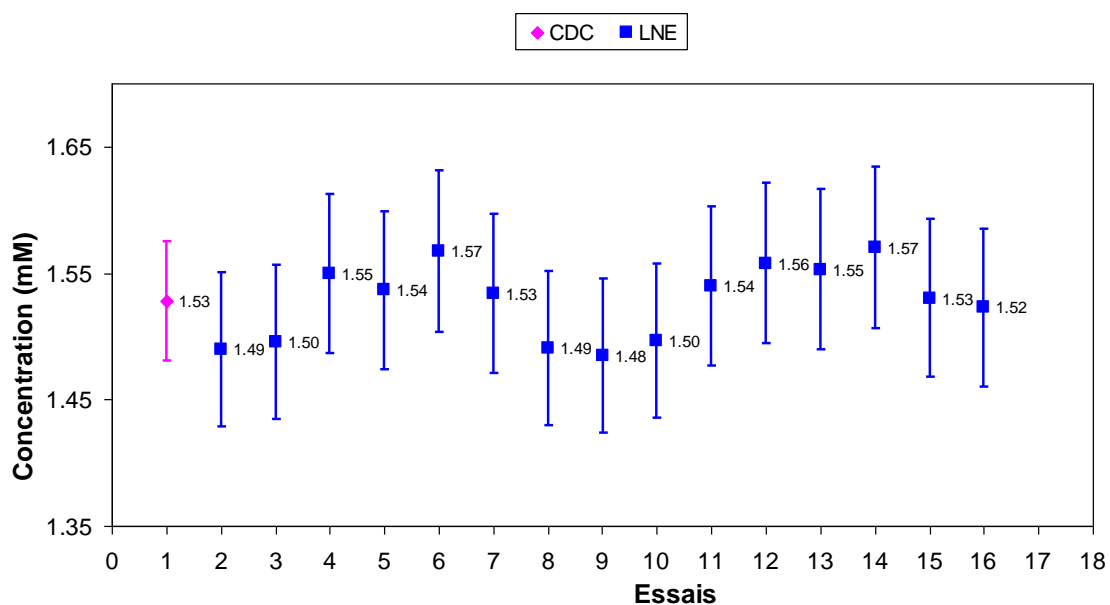


Figure 36 : Contrôle de justesse de la méthode de référence pour le dosage du HDL-cholestérol avec le MRC LNE L2.

### 2.2.2. LDL-cholestérol

Les données de justesse correspondant au dosage du LDL-cholestérol sont reportées dans la Figure 37 (MRC LNE1) et Figure 38 (MRC LNE L2).

MRC LNE - L1					
	Valeur mesurée (mmol/L)	Incertitude élargie ( $k=2$ ) (mmol/L)	Valeur de référence (mmol/L)	Incertitude élargie ( $k=2$ ) (mmol/L)	Ecart normalisé
Jour 1	1.99	0.083	2.01	0.059	0.29
	1.98	0.082	2.01	0.059	0.31
Jour 2	2.08	0.087	2.01	0.059	0.67
	2.04	0.085	2.01	0.059	0.24
	2.06	0.086	2.01	0.059	0.40
Jour 3	2.03	0.084	2.01	0.059	0.11
	2.02	0.084	2.01	0.059	0.01
Jour 4	2.01	0.083	2.01	0.059	0.09
	2.02	0.084	2.01	0.059	0.03
	2.02	0.084	2.01	0.059	0.09
	2.04	0.085	2.01	0.059	0.28
Jour 5	1.95	0.081	2.01	0.059	0.59
	1.95	0.081	2.01	0.059	0.63
<b>Moyenne</b>	<b>2.01</b>				
<b>biais</b>	<b>-0.01%</b>				
<b>Ecart-type</b>	<b>0.04</b>				
<b>CV</b>	<b>1.9%</b>				

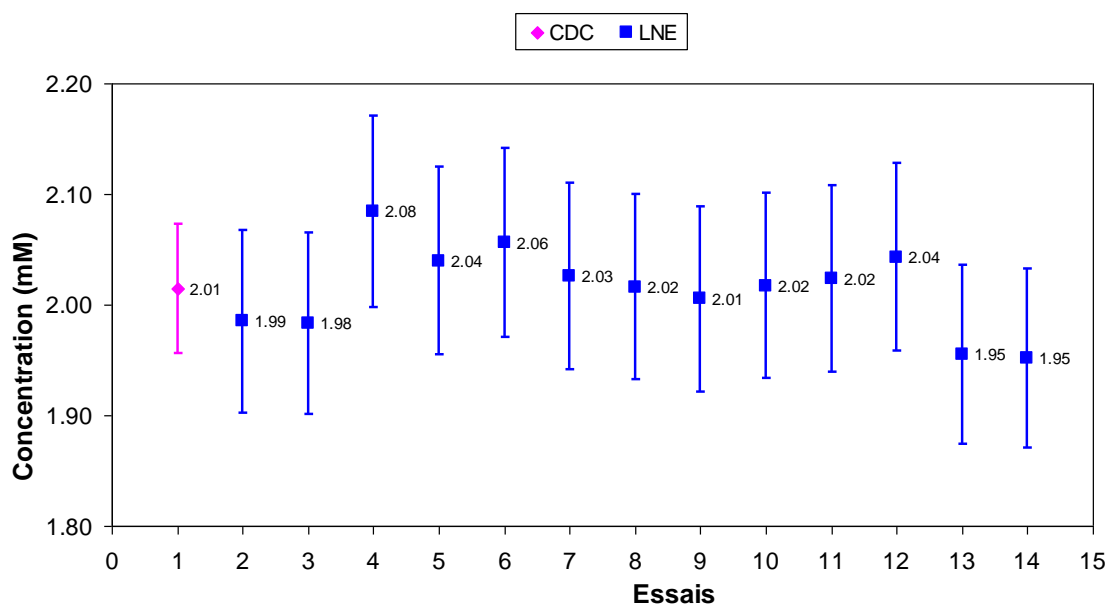
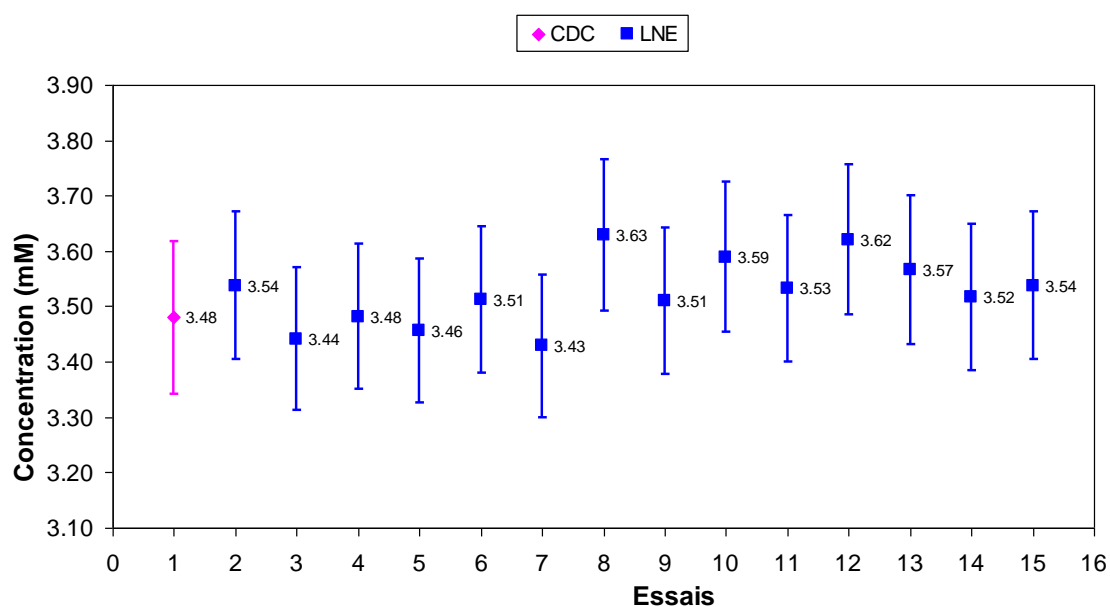


Figure 37 : Contrôle de justesse de la méthode de référence pour le dosage du LDL-cholestérol avec le MRC LNE L1.

MRC LNE - L2					
	Valeur mesurée (mmol/L)	Incertitude élargie ( $k=2$ ) (mmol/L)	Valeur de référence (mmol/L)	Incertitude élargie ( $k=2$ ) (mmol/L)	Ecart normalisé
Jour 1	3.54	0.133	3.48	0.138	0.30
	3.44	0.129	3.48	0.138	0.20
Jour 2	3.48	0.131	3.48	0.138	0.01
	3.46	0.130	3.48	0.138	0.13
	3.51	0.132	3.48	0.138	0.17
	3.43	0.129	3.48	0.138	0.27
	3.63	0.136	3.48	0.138	0.77
	3.51	0.132	3.48	0.138	0.15
Jour 3	3.59	0.135	3.48	0.138	0.57
	3.53	0.133	3.48	0.138	0.27
	3.62	0.136	3.48	0.138	0.73
	3.57	0.134	3.48	0.138	0.45
Jour 4	3.52	0.132	3.48	0.138	0.19
	3.54	0.133	3.48	0.138	0.30
<b>Moyenne</b>	<b>3.53</b>				
<b>biais</b>	<b>1.31%</b>				
<b>Ecart-type</b>	<b>0.06</b>				
<b>CV</b>	<b>1.8%</b>				



**Figure 38 : Contrôle de justesse de la méthode de référence pour le dosage du LDL-cholestérol avec le MRC LNE L2.**



Les écarts normalisés calculés pour la totalité des valeurs mesurées aux deux niveaux de concentration étaient inférieurs à 1 démontrant qu'elles n'étaient pas significativement différentes de la valeur de référence. De plus, les biais obtenus avec la méthode implémentée au laboratoire étaient de -0,01 % pour le niveau 1 et de +1,31 % pour le niveau 2. Ils étaient donc inférieurs aux critères de biais fixés à 2 %. Concernant la fidélité de la méthode, les CV obtenus étaient de 1,9 % pour le niveau 1 et de 1,8 % pour le niveau 2 et étaient donc inférieurs au CV maximum toléré de 2% [165].

Les critères de validation en termes de biais et de CV étaient inférieurs à ceux fixés initialement (Tableau 12). Cependant afin de conforter ces résultats, une participation à une intercomparaison serait souhaitable.

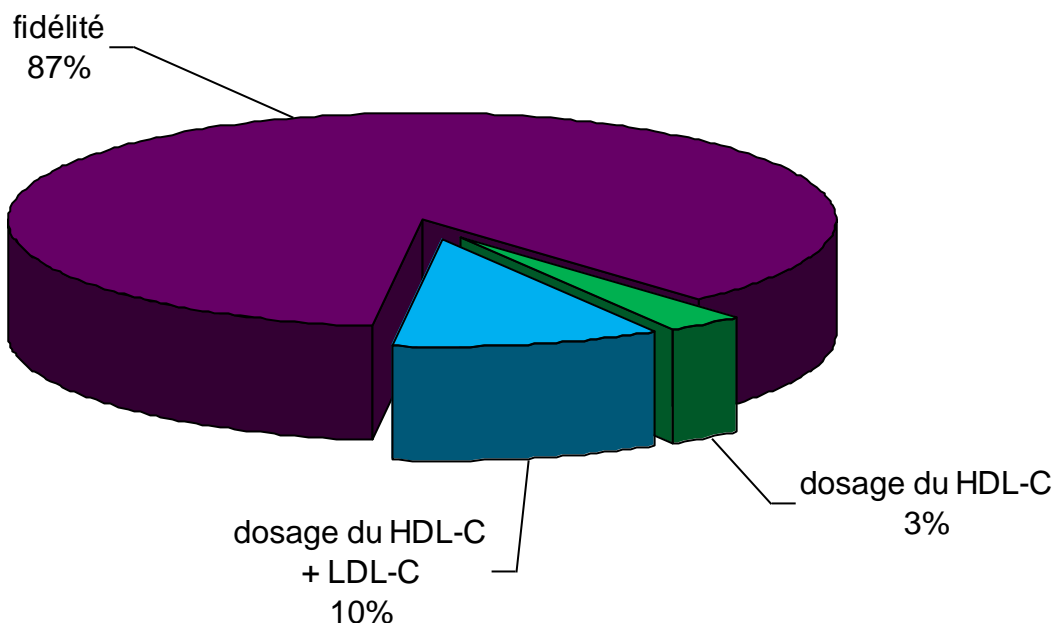
### **2.3. Estimation des incertitudes**

Un exemple de budget d'incertitude, réalisé à partir de l'échantillon MRC LNE L1, est détaillé en Figure 39. Les incertitudes élargies ( $k=2$ ) obtenues sur cet échantillon pour le dosage du LDL-cholestérol étaient de 4,16 %.

La composante majoritaire est la fidélité et correspond à 87 % de l'incertitude totale. Cette importante variabilité est expliquée par le fait que la mesure du LDL-C est déduite de celle du HDL-C et de la fraction « HDL-C+LDL-C ». L'incertitude sur la mesure du LDL-C cumule donc celles liées à ces deux mesures. De plus, la  $\beta$ -quantification n'est pas une méthode primaire et il n'y a pas d'étalon interne permettant de compenser les pertes potentielles de matériel au cours des différentes étapes de préparation de l'échantillon. Cela a pour conséquence une plus grande variabilité dans les résultats et par conséquent une incertitude plus importante que pour la mesure du cholestérol total. Ceci est également vrai pour la mesure du HDL-C ainsi que pour la fraction « HDL-C + LDL-C » (Figure 40 et Figure 41).

Parmi les autres composantes, 10 % de l'incertitude provient de la mesure du HDL-C et du LDL-C après l'étape d'ultracentrifugation et 3 % de la mesure du HDL-C après précipitation.

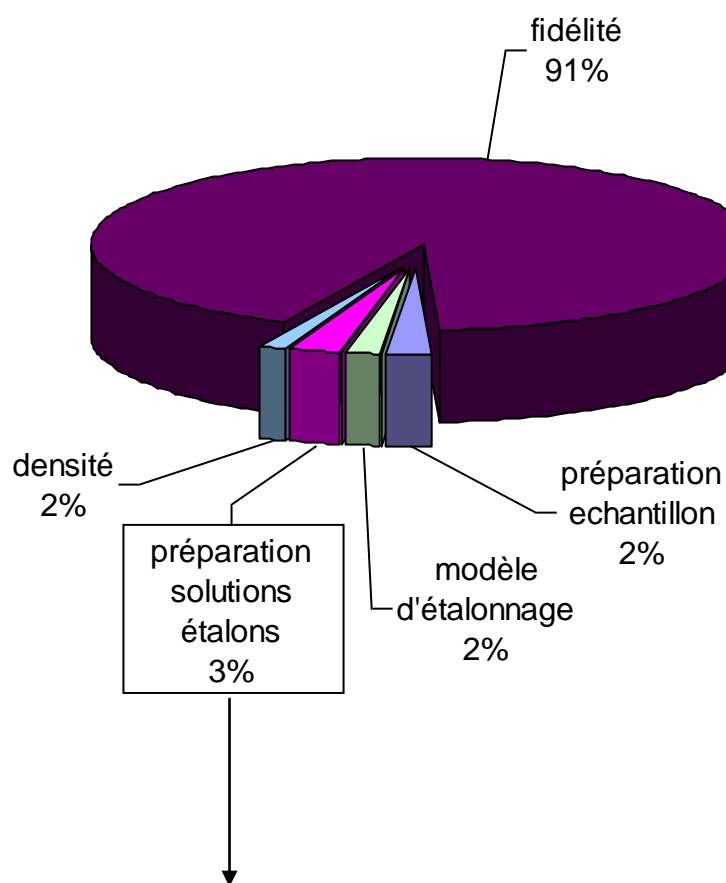
Ces résultats sont expliqués par la différence de concentration en cholestérol dans ces deux échantillons. La concentration en cholestérol dans la fraction après ultracentrifugation étant quasiment trois fois supérieure à celle après précipitation l'incertitude liée à cette mesure, exprimée en valeur absolue, contribue plus au budget global.



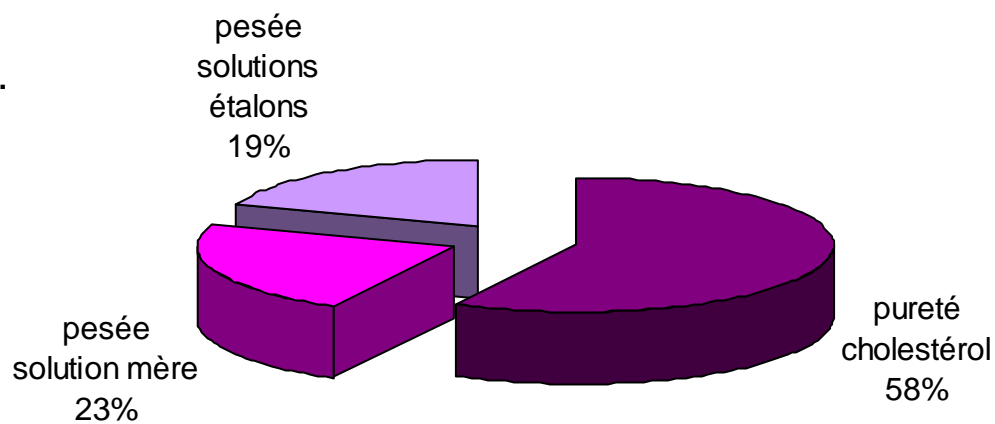
**Figure 39 : Budget d'incertitude obtenu avec l'échantillon MRC LNE L1 pour la mesure du LDL-cholestérol par  $\beta$ -quantification.**

Concernant le dosage du cholestérol après ultracentrifugation (HDL-C+LDL-C), la principale source d'incertitude correspond à la fidélité de la méthode avec une proportion de 92 % (Figure 40). Ce pourcentage est expliqué par la dispersion de la méthode elle-même illustrée par un CV de 1,9 %. La deuxième source d'incertitude, avec 3 %, est liée à la préparation des solutions étalons. Parmi ces 3 %, plus de la moitié de l'incertitude provient de la pureté de l'étalon primaire qu'il n'est pas possible d'améliorer. La distribution du budget d'incertitude correspondant à la préparation des solutions étalons est très similaire à celle observée pour le cholestérol total car l'étalonnage des deux méthodes est identique. Les incertitudes associées à la préparation des échantillons correspondent à 2 % du budget final, le modèle d'étalonnage contribue à 2 % et la mesure de la densité à 1 %.

A.



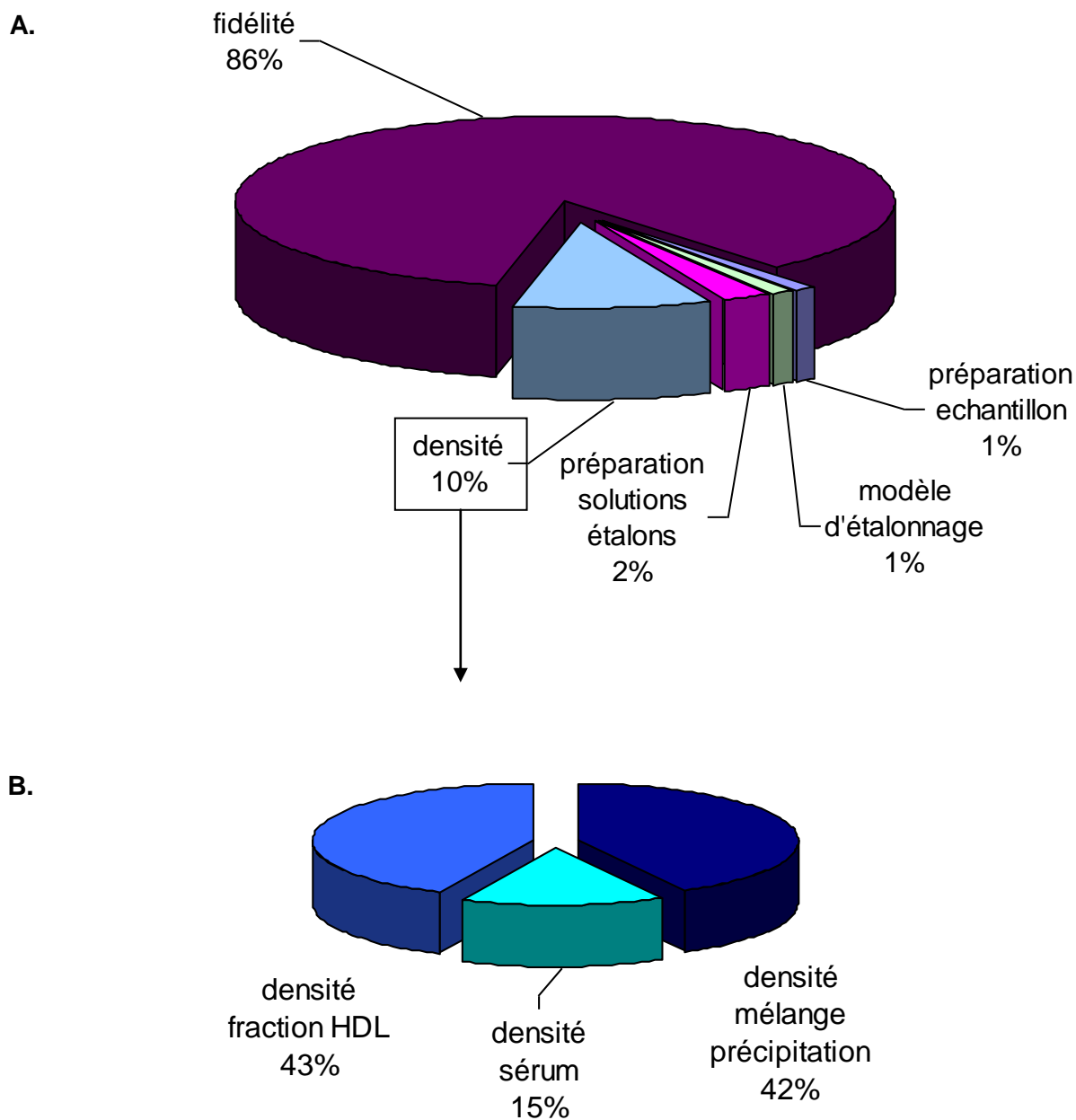
B.



**Figure 40 : Budget d'incertitude obtenu avec l'échantillon MRC LNE L1 pour le dosage du cholestérol après ultracentrifugation.**

**A. Budget global d'incertitude. B. Sources d'incertitude liées à la préparation des solutions étalons.**

Le budget d'incertitude correspondant au dosage du HDL-cholestérol, effectué après l'étape de précipitation, a été déterminé et est représenté Figure 41. Les incertitudes élargies ( $k=2$ ) obtenues avec cette méthode sur l'échantillon LNE L1 étaient de 3,01 %.



**Figure 41 : Budget d'incertitude obtenu avec l'échantillon MRC LNE L1 pour la mesure du HDL-cholestérol par combinaison d'ultracentrifugation et précipitation.**

**A. Budget global d'incertitude. B. Sources d'incertitude liées à la mesure de densité.**

La principale composante de ces incertitudes correspond à la fidélité de la méthode, qui est de 86 %. La part de la fidélité est plus faible que pour la mesure de la fraction « HDL-C+LDL-C ». Ces résultats sont expliqués par une dispersion plus faible des valeurs mesurées. Le CV obtenu pour la mesure du HDL-C était de 1,3 % alors que celui pour la mesure du « HDL-C+LDL-C » était de 1,9 %. Ce CV de 1,9 % est expliqué par la plus faible reproductibilité de l'étape d'élimination des VLDL. En absence d'étalonnage interne il est très difficile de reproduire parfaitement cette étape d'un échantillon à un autre. Il est possible qu'une faible quantité de VLDL ne soit pas éliminée entraînant un biais positif. Il est également possible que des IDL soient également éliminées entraînant dans ce cas un biais négatif. Cette variabilité est masquée lors de la mesure du HDL-C grâce à l'étape de précipitation des lipoprotéines contenant l'apoB. Lors de cette étape les LDL mais également les VLDL restantes et les IDL, seront précipitées et seul le cholestérol associé aux HDL sera dosé.

La deuxième principale source d'incertitude, représentant 10 % du budget global, est la mesure de la densité. Cette importante contribution est expliquée par le fait que la densité est mesurée à 3 reprises durant le processus analytique. Les densités du sérum, du mélange de précipitation et de la fraction HDL sont déterminées (Figure 34 et Figure 41.B).

La préparation des solutions étalons correspond à 2 % du budget final, et tout comme pour le cholestérol total et le « HDL-C+LDL-C », la source majeure d'incertitude est liée à la pureté de l'étalon primaire NIST 911c.

Pour finir, la source d'incertitude liée au modèle d'étalonnage et celle liée à la préparation des échantillons correspondent à 1 % du budget total.

Pour conclure, les incertitudes élargies ( $k=2$ ) obtenues sur l'échantillon MRC LNE L1 pour la mesure du HDL-C étaient de 3,01% et de 4,2 % pour la mesure du LDL-C. Ces valeurs étaient similaires aux incertitudes rendues par le CDC, qui étaient de 2,9 % à la fois pour le HDL-C et pour le LDL-C. Tout comme le cholestérol total, la composante principale du budget d'incertitude pour la mesure du HDL-C et du LDL-C est la fidélité. L'incertitude plus importante obtenue pour le LDL-C est expliquée par la variabilité due à l'élimination des VLDL qui est l'étape clé de ce protocole. Afin de réduire ces incertitudes il est nécessaire de maîtriser cette étape du protocole.

La  $\beta$ -quantification n'est pas une méthode de référence primaire, c'est pour cela que l'incertitude est plus importante que celle obtenue pour la mesure du cholestérol total. Il n'y a pas d'étalon interne permettant de compenser les pertes de matériel notamment au cours des étapes d'élimination des VLDL et de précipitation.

Au vu des résultats concernant la justesse et la fidélité intermédiaire de la méthode ainsi que l'estimation des incertitudes élargies, la  $\beta$ -quantification a été validée au laboratoire.

Il serait cependant intéressant de conforter cette méthode en participant à une intercomparaison. Cela nous permettrait également de comparer nos niveaux d'incertitudes à ceux rendus par d'autres laboratoires nationaux de métrologie.

### 3. Méthode de référence pour le dosage des triglycérides

#### 3.1. Protocole analytique

##### 3.1.1. Préparation des échantillons et des étalons

La méthode de référence implémentée au laboratoire est inspirée de la méthode développée par Edwards *et collaborateurs* [164]. La principale différence entre ces deux méthodes est le choix de la molécule marquée qui était du  $^{13}\text{C}$ -glycérol dans la publication d'Edwards, alors que la molécule utilisée au laboratoire était de la trioléine marquée trois fois au carbone 13 sur le squelette glycérol. La trioléine subit l'étape d'hydrolyse et le marquage est conservé durant les différentes étapes du protocole analytique. Les étalons et les échantillons sont préparés par gravimétrie et subissent les mêmes processus.

Des premiers essais ont été réalisés avec comme étalon primaire la tripalmitine pure (NIST 1595). Des biais relatifs reproductibles de  $-8\%$  ont été observés. L'origine de ces biais n'a pas pu être identifiée. Un étalonnage en matrice avec du sérum certifié (NIST 1951b) a permis de réduire ces biais à moins de  $2\%$  mettant en évidence une différence de comportement entre les triglycérides présents dans les étalons et dans les échantillons de sérum.

L'étalonnage de la méthode de référence implémentée au laboratoire est réalisé en matrice avec l'étalon secondaire NIST 1951b. Un étalonnage en sérum consomme une quantité importante de matériel, il a donc été nécessaire de diluer l'échantillon de sérum afin de minimiser les volumes à prélever. L'échantillon NIST 1951b a donc été dilué dans du tampon Tris-HCl (pH 7,5; 0,5 mmol/L, 0,25 % Triton X100) afin d'obtenir une concentration finale de 0,25 mmol/L. Une solution mère de [ $^{13}\text{C}_3$ ]-trioléine à une concentration de 0,25 mmol/L a également été préparée dans du toluène afin que la même quantité de trioléine de 11,1  $\mu\text{g}$  soit contenue dans tous les échantillons et étalons.

Les volumes à prélever pour préparer une gamme d'étalonnage dont le rapport de quantité de matière est comprise entre Q0,8 et Q1,2 sont présentés dans le Tableau 17.

	Volume de la solution de NIST 1951b (0,25 mmol/L)	Volume de la solution de [ $^{13}\text{C}_3$ ]-trioléine (0,25 mmol/L)
Q $\approx$ 0,8	40 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$
Q $\approx$ 0,9	45 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$
Q $\approx$ 1,0	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$
Q $\approx$ 1,1	55 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$
Q $\approx$ 1,2	60 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$

**Tableau 17 : Volumes respectifs des solutions mères de NIST 1951b et de trioléine marquée.**

*Volumes à ajouter pour obtenir des rapports de 0,8 / 0,9 / 1,0 / 1,1 et 1,2 entre la masse de glycérol et de glycérol marqué*

Afin de minimiser les incertitudes de mesure liées à l'homogénéité de l'échantillon, les échantillons sont préparés en diluant au minimum 25 µL d'échantillon de sérum à doser dans du tampon Tris-HCl (pH 7,5, 0,5 mmol/L, 0,25 % Triton X100). Tout comme pour le cholestérol total, l'approche de dilution isotopique utilisée est l'« *exact matching isotope dilution* ». Afin de se placer à une quantité de composé non marqué équivalente à la quantité de composé marqué ( $Q \approx 1$ ), 50 µL de la solution mère de [ $^{13}\text{C}_3$ ]-trioléine à 0,25 mmol/L sont ajoutés à 50 µL de solution échantillon diluée.

Les solutions étalons et échantillons ont ensuite subi une étape d'hydrolyse pendant 2h30 à 80°C après ajout de 2 mL d'une solution d'hydroxyde de potassium éthanolique à 0,3 mol/L.

Après évaporation des échantillons sous flux d'azote, ceux-ci sont solubilisés dans 200 µL d'un mélange de dérivation d'anhydride acétique/pyridine (1/3, v/v). La réaction de dérivation est une réaction d'acétylation qui est effectuée durant une heure à 65°C.

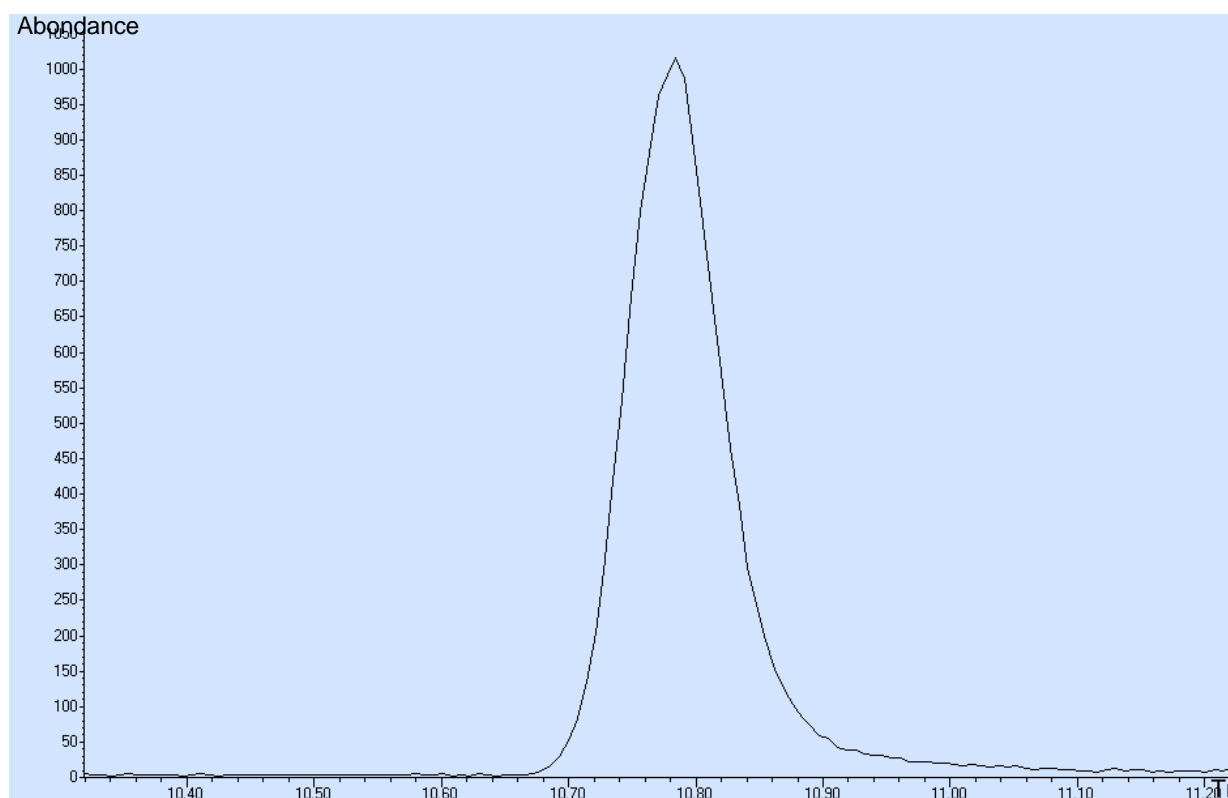
Le glycérol acétylé, appelé également triacétine, est ensuite extrait par un mélange d'acétate d'éthyle/eau dé-ionisée (2/3 v/v). Après 15 minutes d'agitation, la phase aqueuse est éliminée et une étape de lavage est réalisée en ajoutant 5 mL d'une solution de bicarbonate de sodium (8 % m/V). La solution est agitée par retournement puis la phase aqueuse est de nouveau éliminée. 5 mL d'eau sont à nouveau ajoutés à la solution puis après 5 minutes d'agitation la phase organique contenant la triacétine est isolée. La phase organique est ensuite injectée en GC/MS.

### 3.1.2. Paramètres GC/MS

Les conditions chromatographiques sont répertoriées dans le Tableau 18 et les conditions en spectrométrie de masse dans le Tableau 19. Un exemple de chromatogramme et de spectre de masse obtenus avec une solution échantillon de NIST 909C sont représentés sur les Figure 42 et Figure 43. Le temps de rétention du glycérol dérivé est de 10,8 minutes. La méthode de quantification utilisée est réalisée en méthode SIM par dilution isotopique et est décrite en Annexe 3.

	Paramètres
Volume de la seringue	10 µL
Volume d'injection	2 µL
Température de l'injecteur	270°C
Mode d'injection	Split 5:1
Gaz vecteur	hélium
Débit gaz vecteur	1,3 mL/min
Programmation de température du four	15 min à 110°C
	40°C/min jusqu'à 310°C
	15 min à 310°C

**Tableau 18 : Conditions chromatographiques utilisées pour l'analyse des triglycérides.**



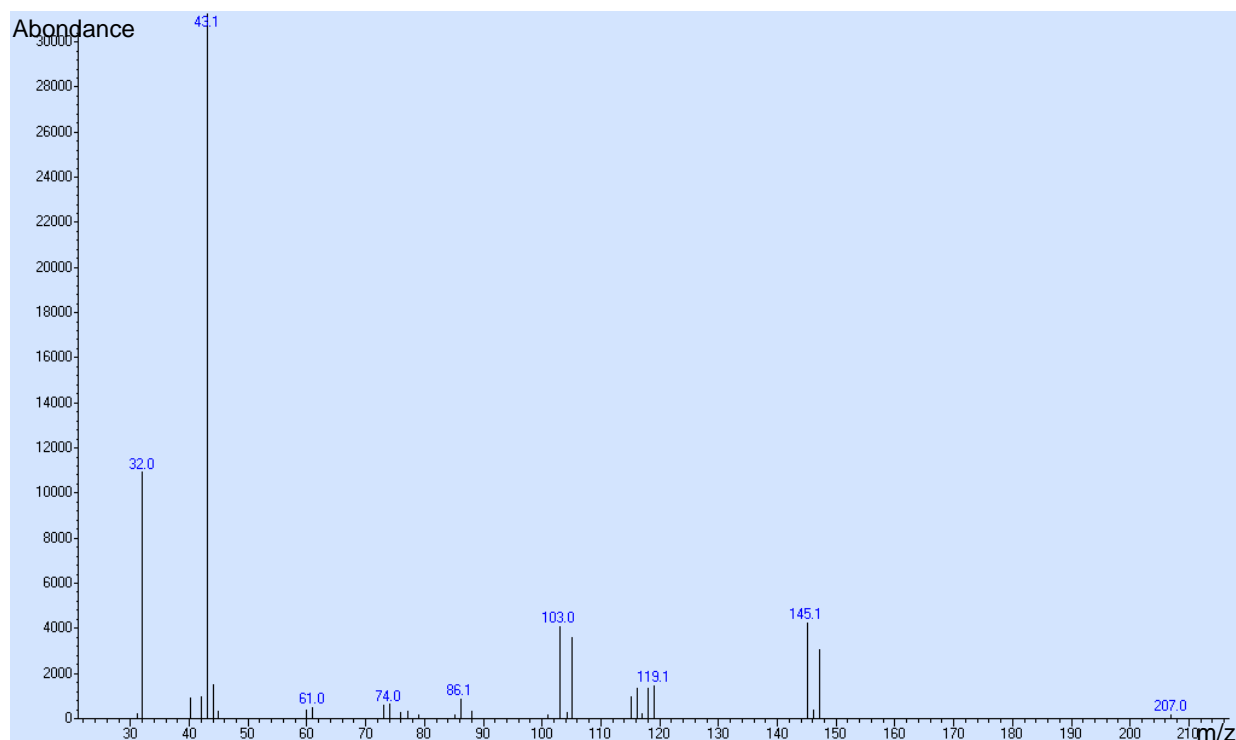
**Figure 42 : Chromatogramme en mode SIM d'une solution échantillon (NIST 909c). L'ion caractéristique observé est l'ion 145 m/z.**



	Paramètres
Mode d'ionisation	Impact électronique
Mode d'acquisition	SIM
Température de la ligne de transfert	270°C
Température de la source	230°C
Température du quadrupôle	150°C
Fréquence d'acquisition des données	20 Hz
Délai de solvant	3 min
Dwell time	50 ms
Ions de quantification	145/147*
Ions de vérification	103/105*

**Tableau 19 : Conditions en spectrométrie de masse utilisées pour l'analyse des triglycérides.**

(\*) Ions correspondant à la molécule marquée



**Figure 43 : Spectre de masse d'une solution échantillon obtenu à partir du sérum NIST 909c auquel a été ajouté la molécule marquée.**

### 3.2. Evaluation de la justesse et de la fidélité

La justesse de la méthode de référence a été validée à l'aide de deux échantillons de sérum différents. Le premier échantillon correspondait au matériau de référence certifié NIST 909c. Les résultats obtenus sont reportés dans la Figure 44. Le deuxième échantillon était le MRC LNE L2 pour lequel les valeurs en triglycérides ont été assignées par le CDC (Figure 45).

Les écarts normalisés calculés à partir des mesures de triglycérides sur les deux échantillons étaient inférieurs à 1. Les valeurs mesurées n'étaient pas significativement différents des valeurs de référence.

Les biais moyens relatifs obtenus avec le NIST 909c étaient de 0,96% et ceux obtenus avec le LNE L2 étaient de -0,45 %. Ils étaient donc inférieurs au biais maximum toléré de 2,5 %. Le CV était de 0,8 % pour le 909c et de 1,6% pour le LNE L2. Les CV obtenus étaient donc inférieurs au CV maximum toléré de 2,5 % [165]. La méthode a pu être validée. Cependant afin de tenir compte de la dispersion de la méthode il est nécessaire de répéter la mesure. Pour cela la valeur de référence assignée à un échantillon est déterminée par deux séries de mesure analysées en triple avec deux droites d'étalonnage différentes.

Afin de s'assurer de la cohérence de nos résultats, les CV obtenus sur les échantillons 909c et MRC LNE L2 ont été comparés à ceux obtenus par le CDC lors de l'assignation des valeurs de référence pour le MRC LNE L1 et L2. Les CV obtenus par le CDC étaient de 1,43 % sur l'échantillon LNE L1 et de 0,63 % sur l'échantillon LNE L2. Les CV obtenus par le LNE et le CDC, déterminés à partir du même nombre de mesures, étaient du même ordre de grandeur.

En conclusion, les critères de validation fixés en termes de biais et de CV ont été respectés (Tableau 12). De plus, les CV obtenus étaient similaires à ceux obtenus par nos pairs.

NIST SRM 909C					
	Valeur mesurée (mmol/L)	Incertitude élargie ( $k=2$ ) (mmol/L)	Valeur de référence (mmol/L)	Incertitude élargie ( $k=2$ ) (mmol/L)	Ecart normalisé
Jour 1	1.21	0.021	1.21	0.017	0.02
Jour 2	1.23	0.021	1.21	0.017	0.59
	1.24	0.021	1.21	0.017	0.89
Jour 3	1.23	0.021	1.21	0.017	0.60
	1.23	0.021	1.21	0.017	0.44
	1.22	0.021	1.21	0.017	0.06
<b>Moyenne</b>	<b>1.23</b>				
<b>Biais (%)</b>	<b>0.96%</b>				
<b>Ecart Type</b>	<b>0.010</b>				
<b>CV (%)</b>	<b>0.8%</b>				

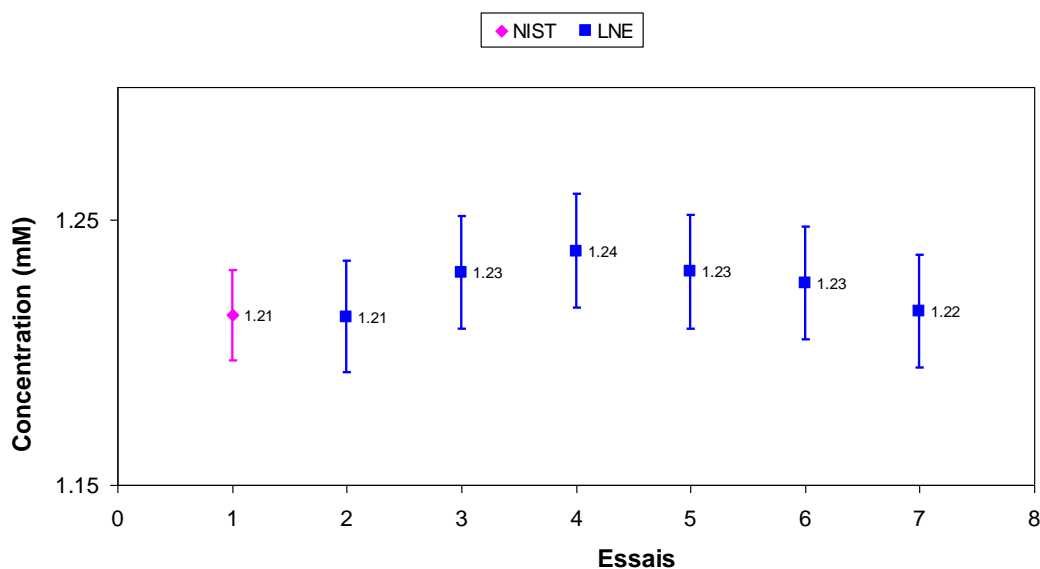
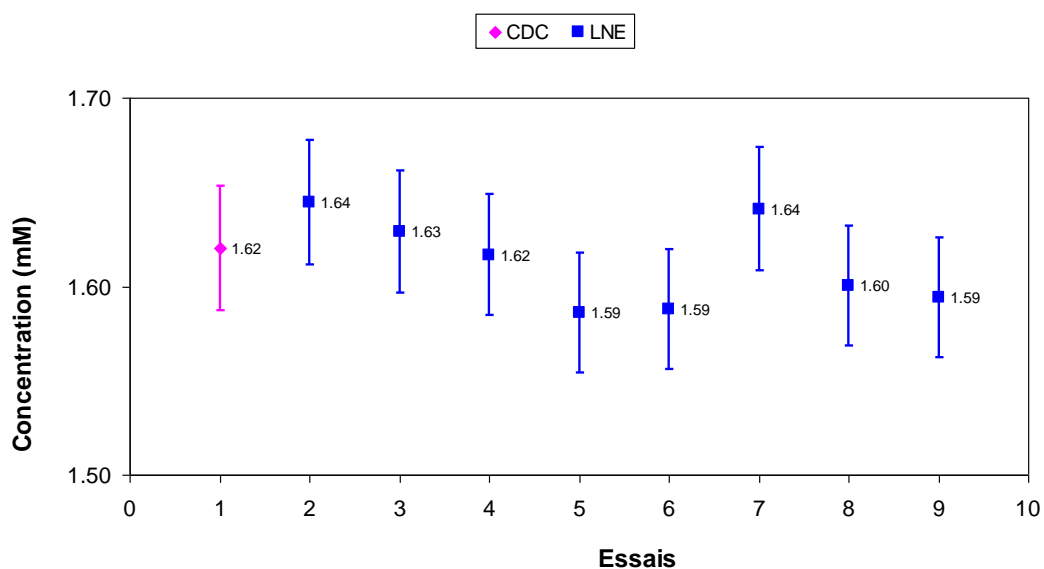


Figure 44 : Contrôle de justesse de la méthode de référence pour le dosage des triglycérides avec le NIST 909c.

MRC LNE - L2					
	Valeur mesurée (mmol/L)	Incertitude élargie ( $k=2$ ) (mmol/L)	Valeur de référence (mmol/L)	Incertitude élargie ( $k=2$ ) (mmol/L)	Ecart normalisé
Jour 1	1.64	0.033	1.62	0.033	0.53
	1.63	0.033	1.62	0.033	0.19
Jour 2	1.62	0.032	1.62	0.033	0.07
	1.59	0.032	1.62	0.033	0.75
	1.59	0.032	1.62	0.033	0.70
Jour 3	1.64	0.033	1.62	0.033	0.45
	1.60	0.032	1.62	0.033	0.43
	1.59	0.032	1.62	0.033	0.56
<b>Moyenne</b>	<b>1.61</b>				
<b>Biais (%)</b>	<b>-0.45%</b>				
<b>Ecart Type</b>	<b>0.03</b>				
<b>CV (%)</b>	<b>1.6%</b>				



**Figure 45 : Contrôle de justesse de la méthode de référence pour le dosage des triglycérides avec le MRC LNE L2.**

### 3.3. Estimation des incertitudes

L'évaluation du budget d'incertitude présenté en Figure 46 a été déterminée avec les données de caractérisation obtenues pour l'échantillon NIST 909c. Les incertitudes élargies ( $k=2$ ) correspondant à ce budget étaient de 1,73 %.

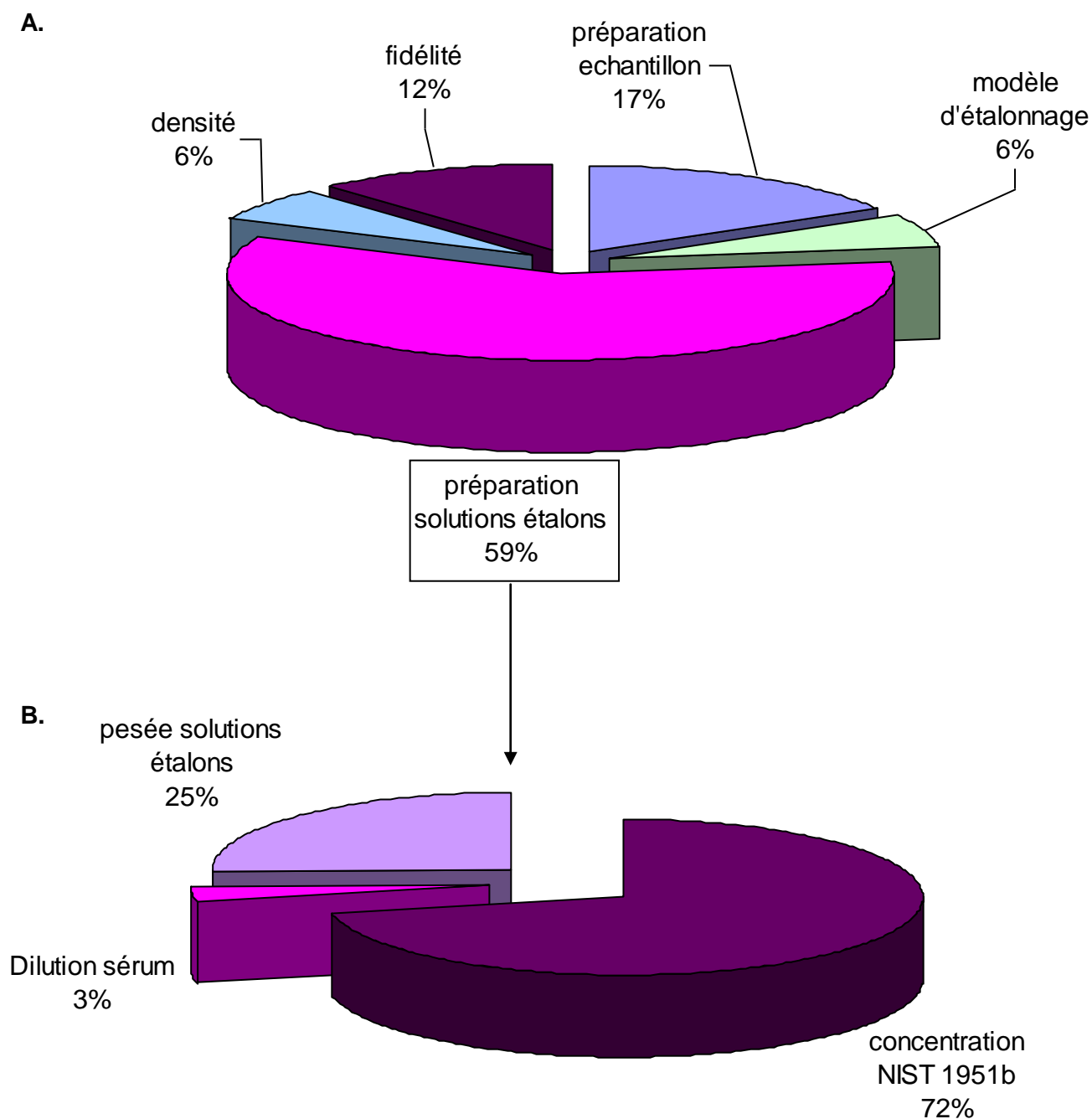


Figure 46 : Budget d'incertitude obtenu pour les triglycérides avec l'échantillon NIST 909c.

A. Budget global d'incertitude, B. Sources d'incertitude rencontrées lors des différentes étapes de préparation des solutions étalons.

La principale source d'incertitude identifiée correspond aux étapes de préparation des solutions étalons, qui contribuent à 59 % du budget total. Parmi ces différentes étapes, la concentration certifiée du matériau de référence utilisé pour la préparation des solutions étalons est à l'origine de 72 % des incertitudes liées à la préparation des solutions étalons.

Cette importante contribution est expliquée par le choix de l'étalon utilisé. Comme expliqué dans le protocole analytique, du fait de la différence de comportement observée entre les triglycérides présents dans les solutions d'étalons primaires et dans le sérum, la méthode de référence utilise un étalonnage en matrice. La solution étalon de cholestérol non marqué est préparée à partir de l'échantillon NIST 1951b qui est un matériau de référence certifié.

L'incertitude liée à la concentration de l'étalon correspond à celle fournie par le certificat d'analyse et prend en considération l'ensemble des étapes du procédé analytique subies par l'échantillon (préparation des solutions étalons et échantillons, fidélité, étalonnage, etc...).

Elle est donc plus importante que lorsque l'étalonnage est réalisé avec un étalon primaire de produit pur. Dans ce cas, l'incertitude liée à la préparation des solutions étalons prend en considération uniquement les étapes de pesée et l'incertitude liée à la pureté de l'étalon primaire.

La deuxième principale source d'incertitude est la préparation des échantillons avec une contribution de 17 %. Cette incertitude est liée à l'étape de pesée de la solution échantillon qui a été optimisée. La contribution de cette étape est plus importante que pour la méthode de référence pour le dosage du cholestérol total car l'échantillon de sérum utilisé subit une étape supplémentaire de dilution avant ajout de la molécule marquée.

Parmi les autres sources d'incertitude la fidélité contribue à 12 %, la densité à 6 % et le modèle d'étalonnage à 6 %. De la même façon que pour la mesure du cholestérol total ces différentes étapes ont été optimisées. La différence de contribution entre ces deux méthodes est expliquée par le fait que le budget global soit rapporté à 100 %. Les principales sources d'incertitude ainsi que leur contribution étant différentes cela entraîne des proportions différentes pour les étapes communes aux deux protocoles.

Les valeurs d'incertitude obtenues pour cet échantillon, correspondant à 1,7 %, étaient en accord avec celles rendues par d'autres laboratoires, notamment lors d'intercomparaisons. En effet, lors de l'intercomparaison IFCC RELA 2011 les incertitudes obtenues par l'ensemble des participants était de 2,0 %. L'incertitude fournie par le NIST dans le certificat de leur MRC 909c est de 1,4 % et celle du 1951b est de 1,2 %.

Pour conclure, le budget d'incertitude a permis de mettre en évidence que la composante majoritaire était la préparation des solutions étalons et plus précisément l'incertitude associée au MRC utilisé. Les étapes clés du protocole ont été optimisées et les résultats obtenus ont démontré que les incertitudes étaient proches de l'état de l'art actuel. Au vu de ces résultats ainsi que ceux concernant la justesse et la fidélité intermédiaire, la méthode a été validée au laboratoire.



## **II. Intérêt des méthodes de référence dans les évaluations externes de la qualité**

Une méthode de référence primaire par ID-GC/MS a été caractérisée et validée au laboratoire afin de doser le cholestérol total. Par la suite, des valeurs de référence ont été assignées à des échantillons de contrôle de la qualité afin d'évaluer la justesse des méthodes utilisées par les laboratoires de biologie médicale.

La méthode implémentée au laboratoire est une adaptation de la méthode du DGKC répertoriée dans la base de données du JCTLM. Les étapes clés du protocole analytique ont été vérifiées et optimisées (cf. Chapitre I.) ce qui a permis de valider la méthode.

La méthode de référence a ensuite été utilisée afin d'assigner des valeurs de référence à des échantillons de contrôle de la qualité du Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie Clinique (CTCB). Le CTCB est un organisateur d'essais d'aptitudes volontaires français auxquels participent environ 170 laboratoires. Les échantillons de sérum analysés lors de cette étude correspondent à cinq pools de sérums congelés. Chaque pool a été préparé à partir de prélèvements de cinq donneurs qui ont subi un cycle de congélation/décongélation avant d'être mélangés puis congelés à nouveau.

Les laboratoires participants ont été regroupés en trois groupes de pairs suivant le principe des méthodes utilisées. Il s'agit de la méthode utilisant un chromogène non-phénolique avec une détection par spectrophotométrie, la méthode utilisant un chromogène phénolique avec une détection par spectrophotométrie et la méthode utilisant un chromogène non-phénolique avec une détection par spectrorélectométrie.

Cette étude a permis de mettre en évidence, en accord avec les résultats obtenus lors de précédentes études, une surestimation de la concentration en cholestérol total par les méthodes utilisées par les laboratoires participants de  $+5,12 \pm 1,10$  %.

Seule la méthode utilisant un chromogène non-phénolique avec une détection par spectrophotométrie (10 % des utilisateurs) répond aux exigences fixées par le NCEP en terme de biais (biais inférieur à 3 %). Le biais de cette méthode, calculé à partir de la valeur de référence, est de  $+1,39 \pm 2,75$  %. Les méthodes utilisant un chromogène phénolique avec une détection par spectrophotométrie (80 % des utilisateurs) et celles utilisant un chromogène non-phénolique avec une détection par spectrorélectométrie (10 % des utilisateurs) ont respectivement des biais de  $+5,51 \pm 1,24$  % et de  $+4,20 \pm 1,44$  %.

Ce surdosage va avoir un impact important sur la prise en charge des patients dyslipidémiques, notamment lors de la mise en place d'un traitement hypolipémiant. En effet, dans la grande majorité des laboratoires de biologie médicale, la concentration en cholestérol total est utilisée via l'équation de Friedewald afin de déterminer le taux de LDL-cholestérol. Une concentration en cholestérol total



positivement biaisée entraîne une surestimation de la concentration en LDL-cholestérol calculée, augmentant de ce fait la probabilité de surévaluer le risque cardiovasculaire. Ceci a des conséquences d'autant plus importantes lorsque les concentrations en LDL-cholestérol sont proches du seuil décisionnel, entraînant un diagnostic erroné de patients considérés à tort comme étant atteint de troubles lipidiques.

Cette étude souligne également l'importance de disposer de valeurs de référence afin d'évaluer la justesse des méthodes de routine. En effet, l'utilisation de la valeur consensuelle comme valeur cible peut entraîner une sous-estimation du biais allant de  $-3,97$  à  $-5,84$  %.

Lorsque le biais est calculé à partir de la moyenne consensuelle, c'est-à-dire la moyenne de tous les résultats obtenus par les laboratoires participants, les méthodes utilisant un chromogène phénolique avec une détection par spectrophotométrie ( $+0,37 \pm 0,13$  %) et celles utilisant un chromogène non-phénolique avec une détection par spectrorélectométrie ( $-0,87 \pm 1,03$  %) répondent aux critères du NCEP alors que la méthode utilisant un chromogène non-phénolique avec une détection par spectrophotométrie ( $-3,54 \pm 2,57$  %) est considérée comme sous-dosant la concentration en cholestérol.

Ceci s'explique par le fait que la méthode utilisée par le plus grand nombre de laboratoires, soit environ 80 % d'entre eux, correspond également à la méthode ayant le biais le plus important ( $+5,51 \pm 1,24$  %). De ce fait, la valeur consensuelle est très proche de la valeur obtenue par cette méthode et est par conséquent positivement biaisée.

Cette étude possède cependant deux principales limitations. L'inconvénient majeur est que la commutabilité des échantillons de contrôle de la qualité est supposée mais pas démontrée rigoureusement du fait de l'importante charge de travail impliquée par la mise en place d'une étude de commutabilité. Cependant, l'homogénéité des résultats obtenus pour les 5 échantillons de contrôle utilisés suggèrent que ces matériaux sont commutables.

La deuxième limitation de cette étude concerne le nombre relativement faible de laboratoires présents dans 2 des 3 groupes de pairs. Seulement 14 à 23 laboratoires utilisent la méthode utilisant un chromogène non-phénolique avec une détection par spectrorélectométrie et 12 à 17 laboratoires utilisent un chromogène non-phénolique avec une détection par spectrophotométrie. Le nombre de laboratoires pourrait être trop faible pour permettre une représentativité suffisante de l'ensemble de leurs groupes de pairs entraînant une erreur de l'estimation de la justesse.

# Article 1

Heuillet M, Lalere B, Peignaux M, De Graeve J, Vaslin-Reimann S, Pais De Barros JP,  
Gambert P, Duvillard L, Delatour V.

*Validation of a reference method for total cholesterol measurement in human serum and  
assignation of reference values to proficiency testing samples.*

Clin Biochem. 2013 Mar;46(4-5):359-64.





## Validation of a reference method for total cholesterol measurement in human serum and assignation of reference values to proficiency testing samples

Maud Heuillet<sup>a</sup>, Beatrice Lalere<sup>a</sup>, Maryline Peignaux<sup>a</sup>, Jacques De Graeve<sup>b</sup>, Sophie Vaslin-Reimann<sup>a</sup>, Jean-Paul Pais De Barros<sup>c</sup>, Philippe Gambert<sup>c</sup>, Laurence Duvillard<sup>c</sup>, Vincent Delatour<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire National de Métrologie et d'Essais (LNE), Department of Biomedical and Organic Chemistry, 1 Rue Gaston Boissier, Paris, France

<sup>b</sup> Laboratoire de Biochimie, University Hospital of Rangueil — Larrey, Toulouse, France

<sup>c</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 866, Université de Bourgogne, Faculté de Médecine, Dijon, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 September 2012

Received in revised form 8 November 2012

Accepted 26 November 2012

Available online 5 December 2012

#### Keywords:

Metrological traceability

Cholesterol assay

Reference method

Isotope dilution mass spectrometry

External Quality Assessment Schemes

Clinical laboratories

### ABSTRACT

**Objectives:** Our objective was to develop a reference method to measure total cholesterol in human serum, in order to assign values and assess the accuracy of field methods in French clinical laboratories.

**Design and methods:** A reference method based on gas chromatography coupled with mass spectrometry and isotope dilution (GC-IDMS) was developed and validated. It was then used to assign reference values to five frozen serum samples from voluntary proficiency testing schemes gathering 170 French clinical laboratories. Three peer groups were defined and bias against the reference method target value was calculated.

**Results:** Accuracy of the reference method was assessed against NIST SRM 1951b. Bias of the reference method was less than 0.5% and imprecision was less than 1.0%. Our study indicated that field methods tended to overestimate total cholesterol concentration, mean bias being  $+5.02\% \pm 1.02\%$ . The most popular methods (phenolic chromogen with spectrophotometric detection, 80% of participants) exhibited the highest bias (peer group mean bias:  $+5.51 \pm 1.24\%$ ). Neither these methods nor those using a non-phenolic chromogen with reflectometric detection (10% of participants, peer group mean bias:  $+4.20 \pm 1.44\%$ ) met NCEP recommendations according to which bias should be less than 3%. Only the methods using a non phenolic chromogen with a spectrophotometric detection met these recommendations (10% of participants, peer group mean bias:  $+1.39 \pm 2.75\%$ ).

**Conclusions:** As all three peer groups provided positively biased results, the consensus mean usually used to assess the trueness of routine methods is biased as well, which results in an erroneous estimation of method bias. Therefore, this study highlights the value added by reference method target values to assess trueness of field methods and monitor performance of clinical laboratories.

© 2012 The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Having reliable measurements in medical biology is essential for the early screening of patients and their appropriate follow-up. Ensuring the metrological traceability of clinical measurements is a key to obtaining comparable results over time and between different laboratories, even if they do not use the same method to quantify a given biomarker [1–4]. Metrological traceability corresponds to the property of the result of a measurement that enables it to be related to stated references through an unbroken chain of comparisons, each of which has stated uncertainties [5]. Several reference standards like ISO EN 17511 [6] and the In Vitro Diagnostics medical devices Directive 98/79/EC states that the traceability of values assigned to calibrators and control materials must be guaranteed through available reference

measurement procedures and/or available reference materials of higher order [7]. Unfortunately, only a few reference methods are available over the world for the main biomarkers used in medical biology and at the national scale. There is an even bigger need to improve the availability of reference methods and certified reference materials. In order to provide both industrial and clinical laboratories that use in-vitro diagnostic methods with tools necessary to establish metrological traceability of medical tests results, the LNE — the French National Metrology Institute — is engaged in the development of reference methods for some of the main biomarkers used in clinical biology.

In this study, we focused on cardiovascular disease (CVD) and especially on lipid testing. Indeed, CVD was the main cause of deaths in 2008 with an estimated 17.3 million deaths worldwide, representing 30% of all global deaths [8]. It is well established that high levels of blood cholesterol are a major risk factor for coronary heart disease [9,10] and that lowering blood cholesterol levels decreases morbidity and mortality [10,11]. These data make cholesterol measurements an excellent candidate for the implementation of traceability systems that could improve the diagnosis of patients. Determination of the lipid profile, including

\* Corresponding author at: Laboratoire National de Métrologie et d'Essais (LNE), Department of Biomedical and Organic Chemistry, 1 Rue Gaston Boissier, 75015 Paris, France. Fax: +33 1 40 43 37 37.

E-mail address: [Vincent.delatour@lne.fr](mailto:Vincent.delatour@lne.fr) (V. Delatour).

total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides measurements, was the second most costly medical test in France in 2010 with an estimated expenditure of €108 million related to the reimbursement of the medical tests alone.

In French External Quality Assessment Schemes (EQAS), target values assigned to quality control materials are consensus values corresponding to the mean of the results obtained by clinical laboratories using field methods. The fact that target values are not determined with a reference method implies that there is no rigorous way to assess the field method trueness in French EQAS. Actually, using a consensus mean assumes that on average the participants' results are not biased, which remains to be proven. The best approach to avoid potentially biased assigned values and make sure that the assigned value is close to the "true" value is to use reference method target values [13]. For this reason, the LNE developed and validated a reference method to measure total cholesterol in human serum with the objective to assess the accuracy of field methods used in French clinical laboratories.

Existing reference methods have been listed by the Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM) [14]. Historically, the first reference method was the Abell Kendal (AK) colorimetric method [15]. However, some compounds such as non-cholesterol sterols, cholesterol precursors and oxidation products were also measured. Because of this lack of specificity, most recent reference methods listed in the JCTLM database are based on isotope dilution mass spectrometry (IDMS) [16–20], which is a primary method offering high accuracy, excellent specificity and very low measurement uncertainties. All of the methods use cholesterol labeled with stable isotopes ( $^{13}\text{C}_2$ ,  $^{13}\text{C}_3$  and  $^2\text{H}$ ) as the internal standard. The main differences between these methods are related to the sample preparation steps and the chromatographic technique that is coupled to mass spectrometry (liquid or gas chromatography). Even though isotope dilution associated with liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-IDMS) is a higher throughput technique than isotope dilution associated with gas chromatography coupled with mass spectrometry (ID-GC/MS), we chose GC-IDMS, as it is more robust. Once validated, our method was then used to assign reference values to samples used in the PT scheme in order to assess the accuracy of methods used in French clinical laboratories.

## 2. Materials and methods

### 2.1. PT scheme design: participating laboratories and proficiency testing materials

The results from five voluntary proficiency tests are reported. These surveys were organized in 2011 and 2012 by the CTCB (Centre Toulousain pour le Contrôle de Qualité en Biologie Clinique) and gathered about 170 French clinical laboratories.

Five serum pools were prepared from non-adulterated human sera obtained from the Etablissement Français du Sang (EFS, Toulouse, France) according to a protocol close to that of the NCCLS C37-A guidelines [21] with some adaptations described hereafter. After collecting individual donor units of whole blood into industry-standard plastic bags with no preservatives nor anti-coagulant (about 500 mL each), units were not centrifuged immediately as described in NCCLS C37-A guidelines: single donations were first allowed to clot for 12 h at room temperature prior to isolation of the serum fraction by centrifugation. Units were then transferred into sterile plastic containers, were frozen and were stored at  $-30\text{ }^\circ\text{C}$  for up to one week. The time between collection of individual donor units and freezing was between 24 and 48 h. For each of the five serum pools, five individual donor units were thawed for 2 h at room temperature, tested for attributes, sterile filtered through a  $0.2\text{ }\mu\text{m}$  membrane and pooled. All samples were negative for Hepatitis B surface antigen (HBsAg), anti-HIV 1 and 2, and Hepatitis C virus antibody (anti-HCV). Serum pools were gently agitated and incubated overnight at  $4\text{ }^\circ\text{C}$  and were then aliquoted into

3 mL vials prior to shipping. Sample homogeneity and stability were tested for each serum pool.

The molar concentration of total cholesterol ranged from  $3.98 \pm 0.07\text{ mmol/L}$  to  $5.17 \pm 0.14\text{ mmol/L}$  and was unknown for all participants. Reference method target values were assigned as described below by the LNE (Laboratoire National de Métrologie et d'Essais). The LNE is accredited according to ISO 15195 [22] and ISO 17025 [23] for total cholesterol measurement in human serum by GC-IDMS and successfully participated in the IFCC ring trials in 2011 [24].

### 2.2. Assignment of reference values by GC-IDMS

The method implemented at the LNE was adapted from the DGKC reference method [17], which had been modified as described below.

#### 2.2.1. Reagents

The primary standard of cholesterol was NIST SRM 911c with a purity of  $99.2 \pm 0.4\%$  (Gaithersburg, MD, USA). Spike solutions were prepared from  $[3,4\text{-}^{13}\text{C}_2]$  cholesterol with an isotopic purity of 99% purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Potassium hydroxide and absolute ethanol were purchased from VWR (Fontenay sous Bois, France), methanol (J.T. Baker) was obtained from Atlantic Labo (Eyssines, France), n-hexane was from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). All solvents were HPLC grade. N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoro-acetamide (MSTFA) was obtained from Macherey-Nagel (Hoerd, France) and anhydrous pyridine was from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

#### 2.2.2. Calibration solutions

Primary solutions were prepared gravimetrically by dissolving exactly 50 mg of pure cholesterol (NIST SRM 911c) and  $[3,4\text{-}^{13}\text{C}_2]$  cholesterol in about 50 mL of absolute ethanol to reach a molar concentration of approximately 2.6 mmol/L. Five calibration blends consisting of mixtures with a mass ratio between the labeled and non-labeled analytes ranging from 0.8 to 1.2 were prepared. Each calibration blend contained a constant amount of  $[3,4\text{-}^{13}\text{C}_2]$  cholesterol of approximately 200  $\mu\text{g}$ . All stock solutions and calibration blends were prepared gravimetrically with a 20 g Sartorius ME36S balance and a 200 g Sartorius ME235S balance.

#### 2.2.3. Serum sample preparation

Samples were prepared gravimetrically by spiking the amount of serum containing about 200  $\mu\text{g}$  of cholesterol with the same amount of  $[3,4\text{-}^{13}\text{C}_2]$  cholesterol to obtain an approximately equimolar ratio of labeled versus non-labeled cholesterol (Fig. 1). Absolute ethanol was then added to obtain a total volume of approximately 5 mL. 0.6 mL of an 8.9 mol/L aqueous potassium hydroxide solution was added. The mixtures were kept at  $60\text{ }^\circ\text{C}$  for 2 h to achieve complete saponification of the cholesterol esters. The blends were left at room temperature for a few minutes, and then 5 mL of water and 5 mL of n-hexane were added to the mixture. After shaking, the organic layer was transferred to a clean 6 mL screw-capped tube and was evaporated to dryness.

#### 2.2.4. Derivatization

The samples and calibration blends were evaporated to dryness at  $60\text{ }^\circ\text{C}$  under a nitrogen stream and the residue was redissolved in 5 mL of methanol. 100  $\mu\text{L}$  of each solution was evaporated to dryness under a nitrogen stream. The residue was then dissolved in 150  $\mu\text{L}$  of MSTFA/pyridine (1/2, vol/vol) and the derivatization was performed for 30 min at  $60\text{ }^\circ\text{C}$ . In DGKC's original reference method, the derivatization reaction was performed with MSTFA alone for 20 min at  $70\text{ }^\circ\text{C}$ . The derivatization blend was evaporated to dryness under a nitrogen stream and the residue was redissolved in 150  $\mu\text{L}$  of n-hexane prior to GC/MS analysis.

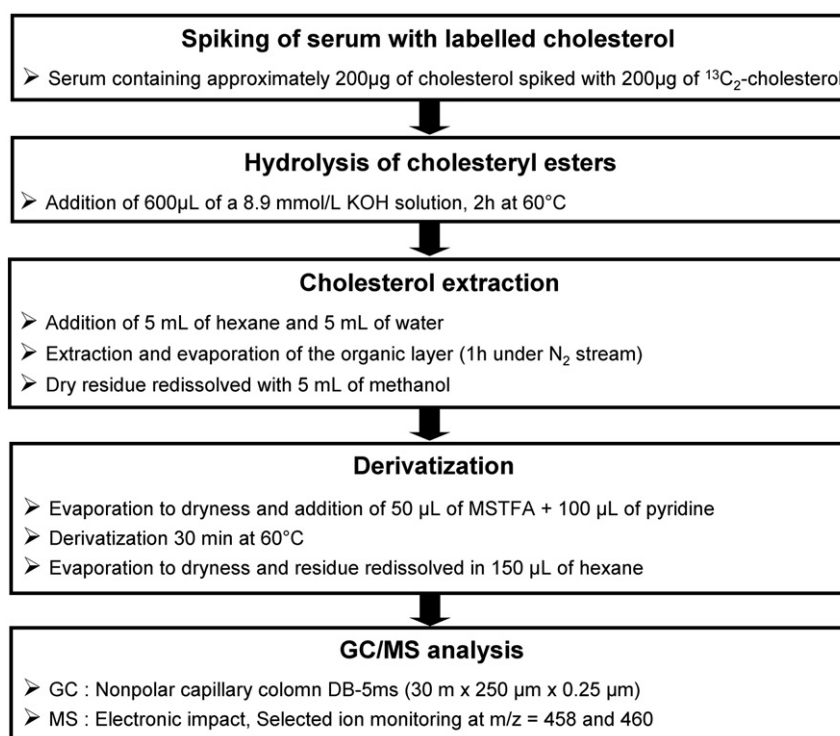


Fig. 1. Description of the main steps in the LNE standard operating procedure for the measurement of total cholesterol in human serum.

#### 2.2.5. GC/MS analysis

The GC/MS measurements were performed using an Agilent 6890N gas chromatograph coupled with an Agilent 5975B quadrupole mass spectrometer. Chromatographic separations were performed on an Agilent DB5-MS column (30 m×250 µm×0.25 µm). The mass spectrometer was operated in the electron ionization mode at 70 keV. The measurements were performed using selected ion monitoring of the molecular ions of the trimethylsilyl derivatives of cholesterol and cholesterol-<sup>13</sup>C<sub>2</sub> at m/z 458 and 460, respectively. The GC/MS analyses were conducted using a 1 µL split injection (20:1) with helium as the gas carrier and a flow rate of 1 mL/min. The GC temperature program used was as follows: 20 °C/min from 100 °C to 280 °C, held for 9 min. The temperatures of the injector and detector were 270 °C and 230 °C respectively.

#### 2.2.6. Calibration

The calibration curve was calculated by linear regression analysis of the results obtained using the five-point calibration set.

#### 2.2.7. Uncertainties

The uncertainty of the measurements was evaluated according to the GUM approach [25] to provide an uncertainty budget accounting for all of the relevant sources of measurement error. A comprehensive mathematical model of the measurement procedure was established and uncertainties arising from random and systematic effects were evaluated individually and combined as variances of associated probability distributions. Uncertainties of the final results were expressed by multiples of standard deviations (expanded uncertainty) with a coverage factor  $k=2$  (95% confidence interval).

#### 2.2.8. Statistical methods and data analysis

All routine assays for total cholesterol measurement rely on enzymatic methods involving cholesterol oxidase. These methods differ in the chromogen (phenolic or non phenolic) and the detection (spectrophotometry or reflectometry). Whereas methods using a phenolic

chromogen only use a spectrophotometric detection, those using a non phenolic chromogen involve either a spectrophotometric detection (Siemens kits exclusively) or a reflectometric detection (Ortho CD kits exclusively). Therefore, three peer groups were defined according to the methods used and were renamed as follows: “phenolic chromogen with spectrophotometric detection”, “non-phenolic chromogen with spectrophotometric detection” and “non-phenolic chromogen with reflectometric detection”.

A double truncation was applied to eliminate values deviating more than 3 standard deviations from the non-truncated mean. For each peer group, the results included the mean value, the relative standard deviation (interlaboratory imprecision), the expanded uncertainty, the relative deviation from the consensus value (D) and the bias against the reference method target value (B). For the reference method, expanded uncertainty was calculated as described above (see Section 2.2.7). For field methods, expanded uncertainty was calculated by multiplying the standard deviation by a coverage factor equal to 2. The relative deviation from the consensus value (D) was calculated according to the following formula:  $D(\%) = 100 \times (X - X_{\text{cons}}) / X_{\text{cons}}$ , where  $X_{\text{cons}}$  is the consensus target value (mean of all results, all methods together) and  $X$  is the mean value obtained by field methods from a given peer group. The peer group mean bias was calculated according to the following formula:  $B(\%) = 100 \times (X - X_{\text{ref}}) / X_{\text{ref}}$ , where  $X_{\text{ref}}$  is the reference method target value.

### 3. Results

#### 3.1. Method optimization and characterization

Different experimental conditions were tested to optimize the main sample preparation steps, especially derivatization and hydrolysis of cholesteryl esters. Different amounts of the 8.9 mol/L KOH solution (0.3, 0.6, 1 and 2 mL), as well as different reaction temperatures (20 °C, 40 °C, 60 °C and 80 °C) were tested, but no significant effect was observed on the efficiency and kinetics of cholesteryl ester

**Table 1**

Accuracy controls carried out with NIST SRM 1951b certified reference materials.

	NIST		LNE		Relative standard deviation (%)	Bias (%)
	Cholesterol molar concentration (mmol/L)	Expanded uncertainty (k=2) (mmol/L)	Cholesterol molar concentration (mmol/L)	Expanded uncertainty (k=2) (mmol/L)		
Level 1	4.804	0.014	4.784	0.102	1.0%	−0.42%
Level 2	6.895	0.022	6.920	0.120	0.8%	+0.36%

**Table 2**

Results of the five voluntary proficiency tests organized by the CTCB.

Sample code	Methods	Number of laboratories	Cholesterol molar concentration (mmol/L)	Relative standard deviation (%)	Expanded uncertainty (k=2) (mmol/L)	Bias against IDMS (%)	Deviation from the consensus mean (%)
CHE 1118	All methods together	174	4.14	2.91%	0.24	4.02%	–
	Phenolic chromogen-spectrophotometric detection	137	4.15	2.85%	0.24	4.27%	0.24%
	Non-phenolic chromogen-reflectometric detection	18	4.09	2.73%	0.22	2.76%	−1.21%
	Non-phenolic chromogen-spectrophotometric detection	17	4.10	2.16%	0.18	3.02%	−0.97%
	GC-IDMS	–	3.98	0.72%	0.07	–	–
CHE 1203	All methods together	174	4.95	2.35%	0.24	5.54%	–
	Phenolic chromogen-spectrophotometric detection	133	4.96	2.17%	0.22	5.76%	0.20%
	Non-phenolic chromogen-reflectometric detection	23	4.95	2.79%	0.28	5.54%	0.00%
	Non-phenolic chromogen-spectrophotometric detection	14	4.75	3.87%	0.37	1.28%	−4.04%
	GC-IDMS	–	4.69	0.98%	0.10	–	–
CHE 1205	All methods together	175	5.40	3.10%	0.34	4.45%	–
	Phenolic chromogen-spectrophotometric detection	136	5.42	2.84%	0.31	4.84%	0.37%
	Non-phenolic chromogen-reflectometric detection	23	5.39	4.64%	0.50	4.26%	−0.19%
	Non-phenolic chromogen-spectrophotometric detection	12	5.10	2.09%	0.21	−1.35%	−5.56%
	GC-IDMS	–	5.17	1.35%	0.14	–	–
CHE 1218	All methods together	172	4.79	3.37%	0.32	5.76%	–
	Phenolic chromogen-spectrophotometric detection	136	4.81	2.72%	0.26	6.21%	0.42%
	Non-phenolic chromogen-reflectometric detection	19	4.74	3.99%	0.38	4.66%	−1.04%
	Non-phenolic chromogen-spectrophotometric detection	13	4.60	2.21%	0.20	1.57%	−3.97%
	GC-IDMS	–	4.53	0.47%	0.06	–	–
CHE 1220	All methods together	142	4.74	3.32%	0.32	5.80%	–
	Phenolic chromogen-spectrophotometric detection	106	4.77	2.86%	0.27	6.47%	0.63%
	Non-phenolic chromogen-reflectometric detection	14	4.65	3.53%	0.33	3.79%	−1.90%
	Non-phenolic chromogen-spectrophotometric detection	12	4.59	2.62%	0.24	2.46%	−3.16%
	GC-IDMS	–	4.48	0.70%	0.07	–	–

hydrolysis (data not shown). The plateau was reached after 1 h of hydrolysis. Similarly, temperature had no significant impact on the derivatization reaction. In contrast, varying the ratio between MSTFA and pyridine showed that a maximum of 33% MSTFA/pyridine (vol/vol) should be used to obtain the highest derivatization yield. The plateau was reached after 30 min of reaction. The amount of cholesterol was the same in all samples and the procedure was optimized so that the amount of serum was not lower than 50  $\mu$ L in the case of serum samples with a high cholesterol concentration and not higher than 500  $\mu$ L in the case of serum samples with a low cholesterol concentration. These conditions are optimal to easily integrate the peaks corresponding to cholesterol and non-labeled cholesterol after GC/MS analysis. The optimized conditions of the main steps of sample preparation are described in Fig. 1.

The limit of detection was 0.027 ng and the limit of quantification was 0.081 ng, which is 15 times lower than the amount of cholesterol contained in the calibration blend with the smaller amount of cholesterol.

Method accuracy was assessed against NIST SRM 1951b, a matrix-certified reference material consisting of 2 levels of frozen human serum with different cholesterol molar concentration levels. As shown in Table 1, bias of the LNE method was −0.42% and imprecision was 1.03% for level 1 (NIST certified molar concentration:  $4.804 \pm 0.014$  mmol/L). For level 2 (NIST certified molar concentration:  $6.895 \pm 0.022$  mmol/L), bias of the LNE method was +0.36% and imprecision was 0.80%. Expanded uncertainty (k=2) was 2.11% for level 1 and 1.73% for level 2. There was no significant difference between NIST certified values and those obtained with our method, which was therefore considered unbiased.

### 3.2. Reference value assignment to PT samples: analysis of measurement uncertainty

LNE's GC-IDMS method was used to assign reference values to CTCB frozen serum samples. The reference method target values are shown in Table 2. During the reference value assignment, the internal quality controls were performed using the certified reference material NIST SRM 1951b level 1, the molar concentration of which was closest to that of the PT materials. As shown in Table 2, bias of the LNE method was between −0.15% and −0.67%. The relative standard deviation of measurements performed on the PT materials was between 0.47% and 1.35%.

As shown in Fig. 2 (sample 1118 taken as an example), the main component of the uncertainty budget was related to imprecision

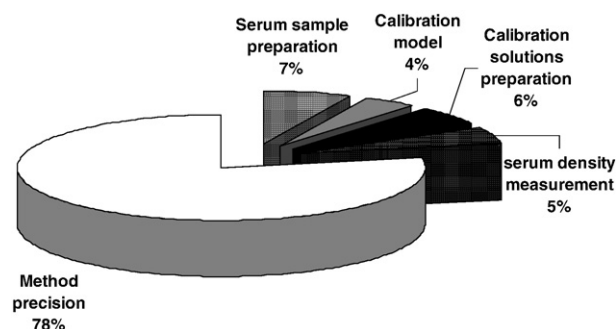


Fig. 2. Uncertainty budget for total cholesterol measurement in CTCB PT material 1118.



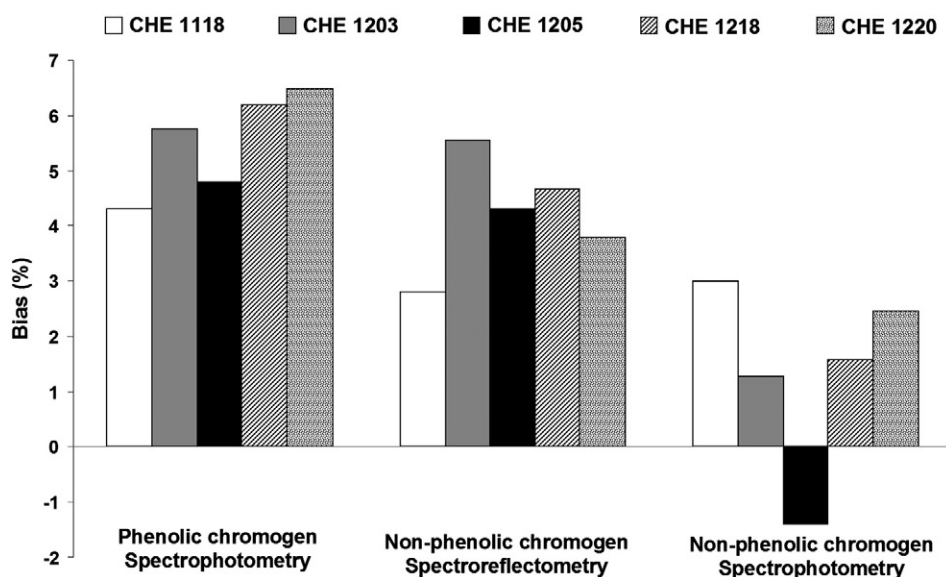


Fig. 3. Peer group mean bias measured on five PT samples consisting in frozen human serum.

(78%). Other main sources of uncertainty were sample preparation (typically weighing of the serum and of the labeled cholesterol solution) and the preparation calibration solution (purity of the primary calibrator, preparation of the stock solutions). Thanks to an optimized procedure, the contribution of serum density was limited to only 5%. This measurement is required to convert mass fractions to molar concentrations and is critically important since the conversion factor is directly applied to the final result, and its related uncertainty spreads in a very significant way to the whole uncertainty budget. Finally, uncertainty related to the calibration model contributed to only 4% of the full uncertainty budget, which shows that linear regression is perfectly suitable. Interestingly, total error of the GC-IDMS method (1.6%) was very close to the expanded uncertainty calculated according to the GUM approach (1.7%).

### 3.3. Assessment of field method accuracy

The accuracy of field methods used by clinical laboratories was assessed against LNE's GC-IDMS method. As described in [Materials and methods](#), methods were classified into three peer groups: phenolic chromogen with spectrophotometric detection (80% of participants), non-phenolic chromogen with reflectometric detection (10% of participants), and non-phenolic chromogen with spectrophotometric detection (10% of participants). As shown in [Table 2](#) and [Fig. 3](#), all three peer groups overestimated cholesterol concentrations, mean peer group bias ranging from +1.39% to +5.51%. Overall, only the methods using a non-phenolic chromogen with spectrophotometric detection met analytical performance goals set by NCEP recommendations according to which analytical bias should be less than 3% [12]. When using the reference method target values, peer group mean bias of methods using a non-phenolic chromogen with spectrophotometric detection was  $+1.39\% \pm 2.75\%$  ( $\pm 95\%$  confidence interval). Methods using a non-phenolic chromogen with reflectometric detection and those using a phenolic chromogen with spectrophotometric detection both failed to meet NCEP recommendations, peer group mean bias being  $+4.20\% \pm 1.44\%$  and  $+5.51\% \pm 1.24\%$ , respectively. When bias was calculated against the consensus mean, peer group mean bias was only  $+0.37\% \pm 0.13\%$  for the “phenolic chromogen with spectrophotometric detection” peer group,  $-0.87\% \pm 1.03\%$  for the “non-phenolic chromogen with reflectometric detection” peer group and  $-3.54\% \pm 2.57\%$  for the “non-phenolic chromogen with spectrophotometric detection” peer group. Our data

indicate that using the consensus mean as target value instead of the reference method target value results in a bias underestimation ranging from  $-3.97\%$  to  $-5.84\%$ .

### 4. Discussion

Our data indicate that the clinical laboratories that participated in this PT scheme generally overestimate total cholesterol molar concentrations, mean bias being  $+5.12\% \pm 1.10\%$ . These results are in good agreement with those obtained in two other studies that aimed to assess the accuracy of field methods with frozen human serum and reference method target values [26,27]. Both surveys reported that field methods tend to overestimate cholesterol molar concentrations. In the study by Thienpont et al., mean bias amounted to  $+5.1 \pm 0.6\%$ , which is very consistent with the values obtained in our study. In the Mexican survey, no mean bias was reported, but it was shown that laboratories provided a value with bias greater than 5% from the reference value in 51% of cases, which reflects a significant overall positive bias.

Serum total cholesterol concentration is necessary for the calculation of LDL cholesterol concentration by the Friedewald formula, the most common method used to estimate it. Thus, a positively-biased total cholesterol concentration induces a positively-biased calculated LDL cholesterol concentration, which increases the likelihood of overestimating cardiovascular risk, especially when LDL cholesterol concentrations are close to threshold values.

It is noteworthy that the number of laboratories using the different groups of methods is heterogeneous and the method using a phenolic chromogen with spectrophotometric detection, the method with the highest bias ( $+5.51\% \pm 1.24\%$ ), was used by the vast majority of laboratories (about 80% of users); which has a strong impact on the overall mean. If the consensus mean or even peer-group specific consensus means had been used as the target values, a method providing very little biased results like that using a non phenolic chromogen with spectrophotometric detection would have been wrongly criticized for underestimating cholesterol concentration of  $-3.54\%$  although the bias measured against the reference method target value fulfills NCEP recommendations (true bias =  $+1.39\%$ ). In contrast, positively-biased methods would not have been identified. This point is an additional argument that illustrates the need for a reference method to assign a true target value to quality control samples.



Our study has some limitations. Its major drawback is that we only assumed and did not demonstrate that our PT materials were commutable. This is the case in most PT schemes using frozen sera, but in the absence of a rigorous and laborious commutability assessment (for example according to CLSI guidelines C53-A [28]), it is not possible to prove that our PT materials were free from matrix effects and behaved like native clinical samples. However, the fact that data from five different PT samples are very consistent together highly suggests that these materials are commutable. Then, concerns could be raised about the fact that the number of participants in the two smallest peer groups was quite low: only 14 to 23 laboratories used non phenolic chromogen with reflectometric detection while 12 to 17 participants used a non-phenolic chromogen with a spectrophotometric detection. These numbers might be too low for them to be representatives of their respective peer groups, which could result in an imperfect estimation of accuracy.

## 5. Conclusion

In this paper, we have shown that field methods tend to overestimate total cholesterol concentration, mean bias being +5.12%. It should be noticed that the most popular group of techniques (methods using a phenolic chromogen with spectrophotometric detection, 80% of participants) did not meet analytical performance goals set by the NCEP, according to which bias should be less than 3%. In this PT scheme, the consensus mean was positively biased, potentially leading to an underestimation of method bias if trueness was assessed against this value. Therefore, this study highlights the need for the reference method target values to assess the accuracy of field methods and to monitor the performance of clinical laboratories.

## References

- [1] Panteghini M. Traceability as a unique tool to improve standardization in laboratory medicine. *Clin Biochem* 2009;42:236–40.
- [2] Panteghini M. Traceability, reference systems and result comparability. *Clin Biochem Rev* 2007;28:97–104.
- [3] White GH. Metrological traceability in clinical biochemistry. *Ann Clin Biochem* 2011;48:393–409.
- [4] Ricós C, Juvany R, Simón M, Hernández A, Álvarez V, Jiménez CV. Commutability and traceability: their repercussions on analytical bias and inaccuracy. *Clin Chim Acta* 1999;280:135–45.
- [5] ISO – International Organization for Standardization. ISO/IEC Guide 99: international vocabulary of metrology – basics and general concepts and associated terms; 2012.
- [6] ISO – International Organization for Standardization. ISO 17511: in vitro diagnostic medical devices – measurement of quantities in biological samples – metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials; 2003.
- [7] Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices. *Off J Eur Commun* 1998; L 331/1–L 331/37.
- [8] WHO. Cardiovascular diseases. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/fr/>; 2011. [Accessed on June 2012].
- [9] Anderson KM, Castelli WP, Levy D. Cholesterol and mortality: 30 years of follow-up from the Framingham study. *JAMA* 1987;257:2176–80.
- [10] Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults, executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III). *JAMA* 2001;285:2486–97.
- [11] Lipid Research Clinics Program. The lipid research clinics coronary primary prevention trial results: I. Reduction in incidence of coronary heart disease. *JAMA* 1984;251:351–64.
- [12] NCEP. Current status of blood cholesterol measurement in clinical laboratories in the United States: a report from the laboratory standardization panel of the National Cholesterol Education Program. *Clin Chem* 1988;34:193–201.
- [13] Koch M, Baumeister F. On the use of consensus means as assigned values. *Accred Qual Assur* 2012;1–4.
- [14] BIPM. JCTLM. <http://www.bipm.org/jctlm/>. [Accessed on June 2012].
- [15] Cooper GR, Smith SJ, Duncan IW. Interlaboratory testing of the transferability of a candidate reference method for total cholesterol in serum. *Clin Chem* 1986;32:921–9.
- [16] Ellerbe P, Meiselman S, Sniegowski LT, Welch MJ, White VE. Determination of serum cholesterol by a modification of the isotope dilution mass spectrometric definitive method. *Anal Chem* 1989;61:1718–23.
- [17] Siekmann L, Hueskes KP, Breuer H. Determination of cholesterol in serum using mass fragmentography: a reference method in clinical chemistry. *Fresenius Z Anal Chem* 1976;279:145–6.
- [18] Wolff Briche CSJ, Carter D, Webb KS. Comparison of gas chromatography and liquid chromatography mass spectrometric measurements for high accuracy analysis of cholesterol in human serum by isotope dilution mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2002;16:848–53.
- [19] Thienpont LM, De Leenheer AP, Stockl D, Reinauer H. Candidate reference methods for determining target values for cholesterol, creatinine, uric acid, and glucose in external quality assessment and internal accuracy control. II. Method transfer. *Clin Chem* 1993;39:1001–6.
- [20] Edwards SH, Kimberly MM, Pyatt SD, Stribling SL, Dobbin KD, Myers GL. Proposed serum cholesterol reference measurement procedure by gas chromatography–isotope dilution mass spectrometry. *Clin Chem* 2011;57:614–22.
- [21] NCCLS. Preparation and validation of commutable frozen human serum pools as secondary reference materials for cholesterol measurement procedures; approved guideline. NCCLS document C37-A. Wayne, Pennsylvania: NCCLS; 1999.
- [22] ISO – International Organization for Standardization. ISO 15195: laboratory medicine – requirements for reference measurement laboratories; 2004.
- [23] ISO – International Organization for Standardization. ISO 17025: general requirements for the competence of testing and calibration laboratories; 2005.
- [24] IFCC ring trials for reference laboratories. <http://www.dgkl-rfb.de:81/>. [Accessed July 1st, 2012].
- [25] ISO – International Organization for Standardization. ISO/IEC Guide 98:2008 guide to the expression of uncertainty in measurement; 2008.
- [26] Thienpont LM, Stockl D, Kratochvíla J, Friedecký B, Budina M. Pilot external quality assessment survey for post-market vigilance of in vitro diagnostic medical devices and investigation of trueness of participants' results. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:183–6.
- [27] Urquiza MP, Mitani Y, Jaimes HON. Proficiency tests to evaluate commercially available IVD kits for glucose and cholesterol measurements. *Accred Qual Assur* 2009;14:269–71.
- [28] CLSI. Characterization and qualification of commutable reference materials for laboratory medicine; approved guideline. CLSI document C53-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.

### **III. Importance de la commutabilité des matériaux d'étalonnage et de contrôle de qualité**

Dans le chapitre précédent, il a été démontré que l'assignation de valeurs de référence à des échantillons de contrôle de la qualité représentait une réelle valeur ajoutée pour l'évaluation de la justesse des méthodes de routine. Cependant, il est également indispensable de disposer d'échantillons de contrôle commutables. Dans cette optique, un matériau de référence certifié (MRC) pour le cholestérol total, les triglycérides, le HDL-cholestérol et le LDL-cholestérol a été caractérisé au laboratoire. L'objectif de cette étude a été d'évaluer la commutabilité de ce MRC en suivant les procédures décrites dans le document CLSI C53-A. Pour cela, les méthodes utilisées par 37 laboratoires de biologie médicale ont été comparées deux à deux ou, lorsque cela était possible, à une méthode de référence. Le MRC a ensuite permis d'évaluer la justesse des méthodes de routine utilisées pour doser ces quatre analytes.

Cette étude a montré que le MRC était commutable pour la majorité des méthodes de routine utilisées pour mesurer les biomarqueurs du bilan lipidique.

La justesse des méthodes de routine a ensuite été évaluée en prenant en considération uniquement les résultats des méthodes pour lesquelles le MRC a été trouvé commutable.

Notre étude a démontré qu'à part deux méthodes présentant un biais négatif (Siemens Advia et Siemens Vista), toutes les méthodes surestimaient la concentration en cholestérol total avec un biais moyen de +5,0 % pour le niveau bas (LNE1) et +3,2 % pour le niveau haut (LNE2). Seule la méthode Siemens Advia respectait les critères NCEP (biais inférieur à 3 %).

Les biais moyens observés pour la mesure des triglycérides étaient de -3,8 % pour le LNE1 et de -0,2 % pour le LNE2. Pour le LNE1, le plus bas en concentration, seulement 5 méthodes sur 10 respectaient les critères NCEP (biais inférieur à 5 %).

Concernant la mesure du HDL-cholestérol, 4 méthodes sur 9 avaient des biais inférieurs à 5 % (recommandation NCEP). De plus, une importante dispersion des résultats a été observée pour certaines méthodes de routine.

Pour finir, une surestimation de la concentration en LDL-cholestérol a été observée que ce soit via une méthode directe ou via l'équation de Friedewald. Lorsqu'une méthode directe était utilisée, seulement 50 % d'entre elles respectaient les critères NCEP de 4 % pour le LNE1 et aucune pour le LNE2. Lorsque la concentration était calculée, seules les méthodes Siemens Advia et Siemens Vista étaient biaisées négativement.

Cette étude a donc permis de mettre en évidence une importante surestimation de la concentration en LDL-cholestérol par la majorité des méthodes de routine aux concentrations proches du seuil décisionnel. La principale conséquence est un nombre accru de faux positifs entraînant chez certains patients la mise en place, à tort, de traitements non nécessaires. Lorsque l'équation de Friedewald

était utilisée, ce surdosage a pu être expliqué par une surestimation de la concentration en cholestérol total ainsi qu'à une sous-estimation en triglycérides et parfois une sous-estimation en HDL-cholestérol. Les résultats obtenus pour ces quatre biomarqueurs ont pour la majorité été confirmés par les données présentes dans la littérature. Concernant les biais obtenus avec les méthodes directes utilisées pour mesurer le LDL-cholestérol, certains résultats étaient discordants avec ceux obtenus lors de précédentes études.

Afin d'expliquer ces différences, trois hypothèses ont été émises. Elles pourraient être expliquées par la variabilité inter-échantillons, par les effets engendrés par l'utilisation de différents lots de réactifs ou d'étalons ou par l'impact de critères d'acceptabilité de commutabilité trop larges.

En effet, une importante dispersion des biais mesurés contre la méthode de référence sur différents échantillons de sérum natifs de concentration proche a été observée. Ces résultats ont montré que les performances des méthodes dépendaient, en plus de leur commutabilité, des propriétés intrinsèques des matériaux, rendant difficile la sélection d'échantillons natifs représentatifs. Comme cela a été exposé dans la partie bibliographique de ce manuscrit, les méthodes homogènes utilisées pour le dosage du HDL-cholestérol et du LDL-cholestérol sont sensibles à différentes interférences. La dispersion des biais observés en fonction des échantillons pourrait ainsi être expliquée par des concentrations élevées en hémoglobine, en bilirubine ou la présence de lipoprotéines anormales. Cependant, les concentrations de ces interférents n'ont pas été mesurées dans les échantillons utilisés. Il n'est donc pas possible de conclure précisément sur les sources de dispersion.

Dans le cas du HDL-cholestérol et du LDL-cholestérol, l'évaluation de la commutabilité a été réalisée uniquement en comparant les méthodes de routine entre elles, ce qui est une des limitations de l'étude. En effet, les volumes d'échantillons natifs étaient insuffisants pour permettre une analyse avec les méthodes de référence. Les méthodes de routine étant potentiellement sensibles aux effets de matrice, la conclusion sur la commutabilité du matériau évalué est susceptible d'être erronée. En effet, un échantillon trouvé commutable peut en réalité ne l'être pour aucune des deux méthodes, du fait d'une compensation des effets matrice. A l'avenir, il sera donc préférable de toujours confronter une méthode de routine à une méthode de référence non sensible aux effets de matrice (par IDMS).

De plus, des effets lots suivant les réactifs ou les étalons utilisés ont été rencontrés et se traduisaient par une importante dispersion des résultats obtenus avec le même analyseur et les mêmes références de réactifs mais des lots différents. Une limitation de notre étude a donc été que le nombre de laboratoires impliqués était insuffisant pour permettre d'obtenir une représentativité suffisante des combinaisons de réactifs et d'étalons les plus utilisées. Lors de prochaines études, il apparaît indispensable de sélectionner attentivement les laboratoires afin que les résultats soient représentatifs de l'ensemble des méthodes utilisées.

Pour finir, les résultats de cette étude ont permis de démontrer qu'il n'était pas suffisant de se baser uniquement sur une approche statistique afin de déterminer les critères d'acceptabilité de commutabilité. Ceci est d'autant plus vrai pour les biomarqueurs, tels que les lipoprotéines, pour lesquels une importante dispersion des résultats est observée. En effet, cette dispersion aura pour conséquence l'établissement d'intervalles de confiance plus larges, c'est-à-dire des biais matriciels acceptables plus importants. Par exemple, les intervalles de confiance moyens observés pour HDL-cholestérol correspondaient à 6,3 % pour LNE1 et 5,3 % pour LNE2 et étaient supérieurs aux critères NCEP (biais inférieur à 5 %). Dans ce cas, deux matériaux commutables pourront avoir des effets de matrice très différents et pourront ne pas donner des résultats de justesse concordants. Il serait donc important de standardiser à l'échelle internationale les critères d'acceptabilité de commutabilité en fonction l'utilisation du matériau qualifié mais également des biomarqueurs évalués.



## Article 2

Vincent Delatour, Maud Heuillet, Anne-Lise Borlot, Maryline Peignaux, Sophie Vaslin-Reimann, Laurence Duvillard and Hubert Vesper

*A commutability study coupled to a multicentric analysis of trueness of total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol and total glycerides assays.*

(Soumis, en révision)



# **A commutability study coupled with a multicenter analysis of the trueness of assays for total cholesterol, LDL-C, HDL-C and total glycerides**

Vincent Delatour<sup>1</sup>, Maud Heuillet<sup>1</sup>, Anne-Lise Borlot<sup>1</sup>, Maryline Peignaux<sup>1</sup>, Sophie Vaslin-Reimann<sup>1</sup>, Laurence Duvillard<sup>2</sup> and Hubert Vesper<sup>3</sup>

1 Laboratoire National de Métrologie et d'Essais (LNE), Department of Biomedical and Organic Chemistry, 1 rue Gaston Boissier, Paris, France

2 Centre Hospitalo-Universitaire de Dijon et Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 866, Université de Bourgogne, Dijon, France

3 Centers for Disease Control and Prevention, Division of Laboratory Sciences, Atlanta, GA, USA

Address correspondence to: Vincent DELATOUR, Laboratoire National de Métrologie et d'Essais (LNE), Department of Biomedical and Organic Chemistry, 1 rue Gaston Boissier, 75015 Paris, France; Telephone: (33) 1 40 43 40 75; Fax: (33) 1 40 43 37 37; e-mail: [Vincent.delatour@lne.fr](mailto:Vincent.delatour@lne.fr)

**Keywords:** commutability, trueness, metrological traceability, certified reference material; cholesterol



## Abstract

**BACKGROUND:** While laboratory tests are the cornerstone of CVD risk assessment and therapeutic management of patients, very few data exist on post-market controls providing information on the performance of commercial assays for total cholesterol, total glycerides, HDL-cholesterol, and LDL-cholesterol. Moreover, the commutability of control materials is rarely evaluated, although it is crucial to ensure that bias measured against a reference method can be attributed exclusively to method inaccuracy rather than matrix effects generated by the control materials.

**METHODS:** A multicenter split-patient-sample study was organized to assess the commutability of two candidate Certified Reference Materials (CRMs) prepared according the NCCLS C37-A guidelines. Thirty-seven clinical laboratories were involved and performed more than 10000 field measurements. Material commutability was characterized according to CLSI C53-A guidelines and trueness assessment relied on results from field methods for which study materials proved to be commutable. Target values were assigned with higher order reference methods listed in the JCTLM database.

**RESULTS:** The two candidate CRMs proved to be commutable for most methods and suitable for the assessment of their trueness. Our results showed that field methods tended to underestimate total glycerides and overestimate total cholesterol, resulting in a marked positive bias in LDL-cholesterol calculated by the Friedewald equation.

**CONCLUSION:** This study highlights the importance of using commutable samples to rigorously assess the trueness of commercial assays. The overestimation of LDL-cholesterol results around the clinical decision-making threshold may generate false positives and the unnecessary prescription of costly therapies.

## Introduction

Dyslipidemia is a well-established risk factor for cardiovascular disease (1,2). The reduction of levels of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) has been shown to reduce the risk of both coronary heart disease (CHD) and stroke. The therapeutic management of dyslipidemic patients is thus essentially based on reducing LDL-C concentrations. In clinical laboratories, LDL-C is mostly calculated by the Friedewald equation from measurements of total cholesterol (TCh), HDL-C and total glycerides (TG) (3) but fully automated assays have been developed for LDL-C direct determination (4). To ensure appropriate screening and follow-up of patients, it is therefore fundamental for these laboratory tests to be accurate and to provide comparable results over time and between different laboratories using different methods. Establishing the metrological traceability of results to higher order reference measurements procedures (RMP) or certified reference materials (CRMs) is a key feature to improve the comparability and accuracy of results. It is also a regulatory requirement imposed by several international standards like the 98/79/EC directive on medical devices (5) and the ISO EN 17511 standard (6), among others. The importance of using higher order RMP to value assign CMRs used as calibrators or quality control materials is well established (7), and today the role of sample commutability is also recognized as critical (8–11). Simply summarized, commutability of a sample corresponds to its ability to behave like true patient samples (6,12,13). When a CRM or a PT sample is analyzed by a field method, bias observed against a RMP actually corresponds to the sum of two components: bias of the considered field method (which includes calibration bias and random bias due to analytic imprecision and non-specificity) and bias due to matrix effects that are generated by the material itself (14,15). To rigorously assess field method trueness, commutable materials should be used so that the contribution of matrix effects is negligible. This statement is also true for calibrators: when non-commutable materials are used as calibrators, this will introduce a calibration bias and the benefit of establishing the traceability of results to a reference method will be lost because the traceability chain will be broken. A recent paper by Zegers et al. highlighted the importance of the commutability of CRMs used as calibrators (16) by taking the example of ceruloplasmin measurement.

In this paper, we assessed the commutability of two candidate CRMs with the objective to investigate their ability to be used as PT samples to monitor trueness of routine TCh, TG, HDL-C and LDL-C assays. As the commutability of a material is method-dependent, 37 clinical laboratories were involved to investigate the robustness of material commutability across the most popular methods used in clinical practice.

## **Materials & methods**

### **MATERIALS**

#### **Candidate Certified reference materials LNE CRM Bio 101a Level 1 and Level 2**

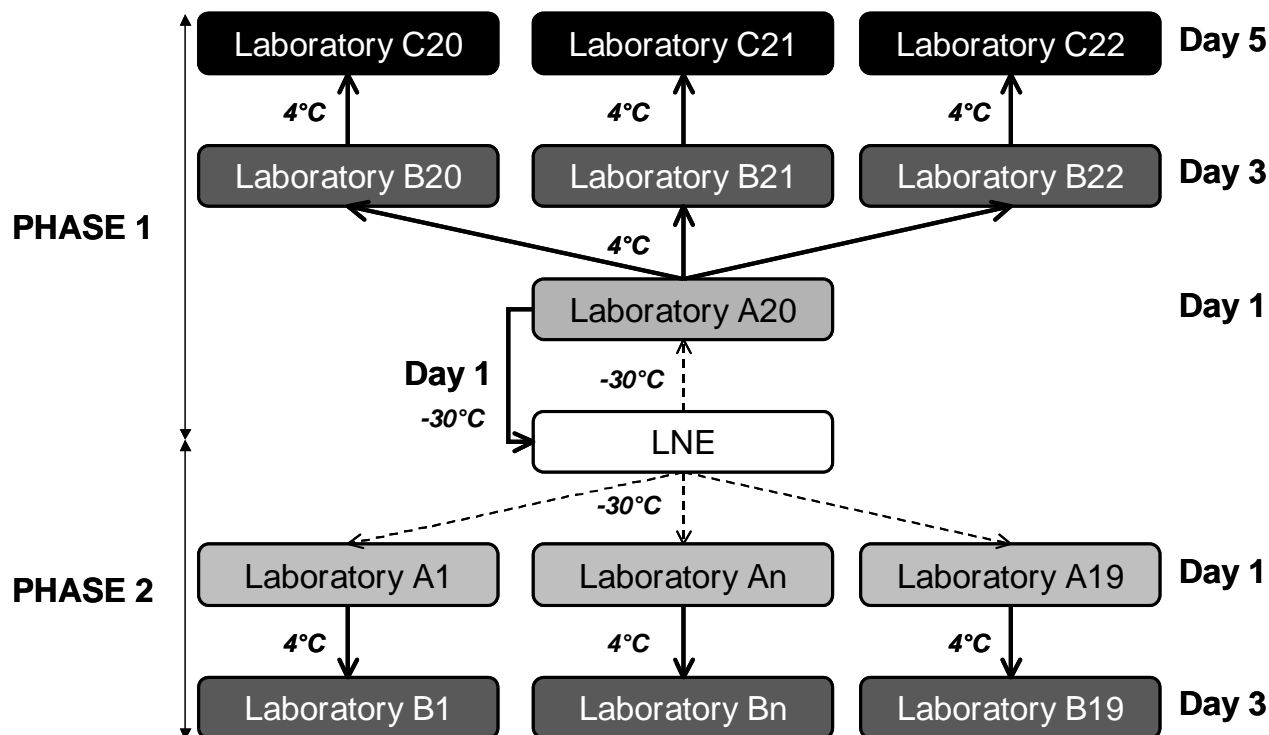
LNE CRM Bio101a Level 1 and Level 2 (hereafter referred to as LNE1 and LNE2) are two candidate CRMs consisting of two pools of frozen human serum with physiological concentrations and pathological values, respectively. These materials are intended for the calibration control and trueness assessment of routine TCh, LDL-C, HDL-C and TG assays. The pools were prepared by Solomon Park Research Laboratories (Kirkland, WA, USA) according to NCCLS C37A guidelines (17) as detailed in Supplemental Data S1.

#### **Native samples**

Twenty clinical laboratories each selected 21-25 authentic clinical specimens consisting of fresh human serum with different concentrations of TCh, TG, LDL-C and HDL-C in order to uniformly cover a broad range of concentrations that bracket those of the analytes of interest in the LNE's candidate CRMs. To ensure that their properties were not modified, native samples were neither pooled nor frozen and no preservative was added.

### **STUDY LOGISTICS**

The study was organized in two phases that took place from January to April 2013. 37 clinical laboratories were involved. While the first phase included seven clinical laboratories split into three groups (A20, B20, B21, B22, C20, C21 and C22), the second phase included 30 laboratories split into 15 pairs (A1-B1, A2-B2, ...). As shown in Figure 1, Group A laboratories selected, prepared and analyzed 21-25 native samples that were divided into aliquots and shipped to the LNE and Group B laboratories. In the first phase of the study, the samples analyzed by Group B laboratories were then shipped and analyzed by Group C laboratories.



**Figure 1: Logistics of the split-samples study**

*In the first phase, a single laboratory (A20) selected, prepared and divided 25 fresh native samples into five aliquots on Day 1. The same day, the first aliquot was analyzed by Lab A20 and the second aliquot was frozen and shipped at  $-30^{\circ}\text{C}$  to the reference laboratory (LNE). On Day 2, the three remaining aliquots were shipped at  $+4^{\circ}\text{C}$  to laboratories B20, B21 and B22, which analyzed the first half of these aliquots on Day 3. On Day 4, the second half of the aliquots were shipped to laboratories C20, C21 and C22 and analyzed on Day 5. In the second phase, each of the 15 Group A laboratories selected, prepared and divided 21 native samples into two aliquots on Day 1. The first aliquot was analyzed the same day in the Group A laboratory. On Day 2, the second aliquot was shipped at  $+4^{\circ}\text{C}$  to another field laboratory (Group B) where the samples were analyzed on Day 3. Native samples were analyzed less than 8 hours after collection by Group A laboratories, less than 36 hours by Group B laboratories and less than 96 hours by Group C laboratories.*

## MEASUREMENT PROCEDURES

### *Clinical measurements*

Clinical measurements were performed by 37 clinical laboratories that were selected to cover the most popular clinical analyzers: 7 Roche Cobas, 6 Siemens Vista, 6 Abbott Architect, 5 Beckman DxC, 3 Ortho-CD Vitros, 3 Beckman AU, 3 Siemens Advia, 2 Roche Modular and 2 Thermo KoneLab. Candidate CRMs and native samples were analyzed in triplicate in the same analytical sequence. All participants were asked to report the analyzer, reagent and calibrator lot numbers with which measurements were performed.

### *Reference measurements*

All reference measurements were performed at the LNE with higher order reference methods listed in the JCTLM database (18). The LNE is accredited according to ISO EN 15195 (19) and ISO EN 17025 (20) standards for the measurement of total cholesterol and total glycerides by GC-IDMS and the measurement of LDL-C and HDL-C by beta quantification (21). The LNE is listed as the “Reference measurement service” in the JCTLM database for the measurement of TCh (7) and has taken steps to join the Cholesterol Reference Method Laboratory Network (CRMLN) (22).

## DATA ANALYSIS

The commutability of study materials was assessed according to CLSI-C53A guidelines (23). In the first phase of the study, clinical measurements of TCh and TG were plotted only against IDMS reference measurements (e.g. A20 Vs IDMS, B20 Vs IDMS, etc...). For HDL-C and LDL-C and all measurements performed during the second phase, only field method results were pair-wise combined so as to generate all possible combinations of methods that analyzed the same native samples. The 21-25-point Deming linear regression was established with XLGENLINE software (NPL, UK) (24) by using a Generalized Least Squares model (GLS). The associated 95% confidence interval was determined locally by calculating the maximum allowable matrix bias UCI above which a given sample was considered non-commutable (see Supplemental Data S3). For a sample analyzed by method A and method B, the relative matrix bias associated with method A

was defined as follows:  $MB (\%) = \frac{C_{A\_obs} - C_{A\_Mod}}{C_{A\_Mod}} \times 100$  , where  $C_{A\_obs}$  is the concentration

measured in practice by method A, and  $C_{A\_Mod}$  is the theoretical concentration that was computed from the 21-25-point regression model to simulate matrix effects on method B results. The conclusion on the commutability of the candidate CRMs for method A was drawn by comparing its matrix bias MB against the maximum allowable matrix bias  $U_{CI}$ .

## Results

### ASSIGNMENT OF REFERENCE VALUES TO STUDY MATERIALS

Results of the reference measurements performed on the LNE's candidate CRMs are shown in Table 1. During method validation and the assignment of values to study materials, accuracy controls were performed on NIST SRM 909c and NIST SRM 1951b obtained from NIST (Gaithersburg, MD, USA). Confirmation measurements were made at the CDC on the LNE's candidate CRMs for LDL-C, HDL-C and TG. According to Supplemental Data S2, LNE's reference methods met the acceptability criteria for allowable imprecision and bias for RMP (25) for all parameters and were therefore considered suitable to assign values to the study samples.

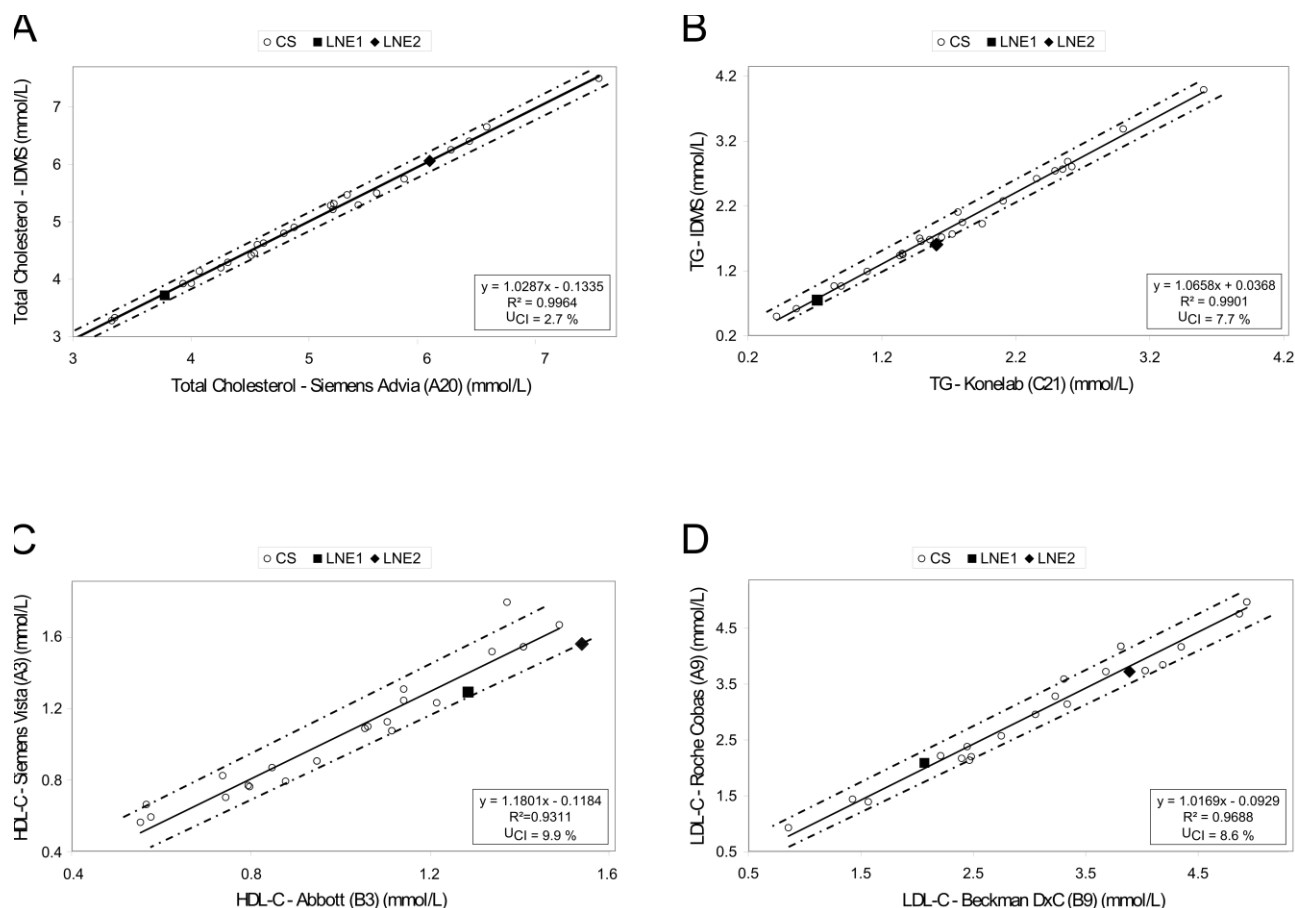
	LNE 1		LNE2	
	Molar concentration (mmol/L)	Expanded Uncertainty (k=2) (mmol/L)	Molar concentration (mmol/L)	Expanded Uncertainty (k=2) (mmol/L)
Total cholesterol	3.60	0.05	5.89	0.09
Total glycerides	0.76	0.03	1.61	0.03
HDL-C	1.29	0.04	1.53	0.06
LDL-C	2.01	0.08	3.53	0.13

**Table 1: results of reference measurements performed on LNE's candidate CRMs.**

*The expanded uncertainty was calculated by multiplying the standard uncertainty by a coverage factor of k=2.*

### ASSESSMENT OF STUDY MATERIALS COMMUTABILITY

Scrutinizing all regression results showed a marked difference between the correlation of measurements obtained for TCh and TG on the one hand and those for LDL-C and HDL-C on the other. Whereas the mean correlation coefficient was 0.9931 for TCh ( $R^2 > 0.99$  in 84% of cases) and 0.9928 for TG ( $R^2 > 0.99$  in 65% of cases), it was only 0.9830 for HDL-C ( $R^2 > 0.99$  in 45% of cases), 0.9829 for calculated LDL-C ( $R^2 > 0.99$  in 22% of cases) and 0.9816 for direct LDL-C ( $R^2 > 0.99$  in 25% of cases). Examples of regression lines are shown in Figure 2 and the detailed results are provided in Supplemental Data S4. The lack of a fit for LDL-C and HDL-C resulted in larger confidence intervals compared with those observed for TCh. For LNE1 and LNE2, respectively, the maximum allowable matrix bias  $U_{CI}$  was 3.9% and 2.8% for TCh, 6.3% and 5.3% for HDL-C, 8.7% and 5.7% for calculated LDL-C, 8.6% and 4.9% for direct LDL-C. For TG,  $U_{CI}$  was larger for low TG concentrations (11.8% for LNE1) than for borderline concentrations (5.7% for LNE2).



**Figure 2: Examples of pair-wise commutability assessments of LNE's candidate CRMs for the measurement of TCh (A), TG (B), HDL-C (C) and direct LDL-C (D).**

*The plotted values are the means of triplicate measurements. The continuous line corresponds to the Deming regression line determined from the 21-25 clinical samples (CS, open dots). The dotted lines correspond to the 95% confidence interval obtained by calculating and fitting all local expanded uncertainties UCI associated with each of the 21-25 native samples.*

Methods	LNE 1 commutability	LNE 2 commutability
<b>Total cholesterol</b>		
Roche Cobas	86% (6/7)	86% (6/7)
Roche Modular	50% (1/2)	100% (2/2)
Siemens Vista	67% (4/6)	83% (5/6)
Siemens Advia	100% (3/3)	67% (2/3)
Beckman DxC	100% (5/5)	100% (5/5)
Beckman AU	100% (3/3)	100% (3/3)
Ortho-CD Vitros	0% (0/3)	67% (2/3)
Abbott Architect	83% (5/6)	100% (6/6)
Thermo Konelab	100% (2/2)	100% (2/2)
<b>TOTAL</b>	<b>81% (30/37)</b>	<b>92% (34/37)</b>
<b>Total glycerides</b>		
Roche Cobas	100% (5/5)	60% (3/5)
Roche Modular	50% (1/2)	100% (2/2)
Siemens Vista	100% (5/5)	80% (4/5)
Siemens Advia	67% (2/3)	67% (2/3)
Beckman DxC	100% (4/4)	100% (4/4)
Beckman AU	100% (2/2)	50% (1/2)
Ortho-CD Vitros	67% (2/3)	100% (3/3)
Abbott Architect	67% (4/6)	83% (5/6)
Thermo Konelab	100% (1/1)	0% (0/1)
<b>TOTAL</b>	<b>84% (26/31)</b>	<b>77% (24/31)</b>
<b>HDL-cholesterol</b>		
Roche Cobas	100% (10/10)	60% (6/10)
Roche Modular	100% (1/1)	0% (0/1)
Siemens Vista	90% (9/10)	50% (5/10)
Siemens Advia	88% (7/8)	50% (4/8)
Beckman DxC	100% (8/8)	63% (5/8)
Beckman AU	86% (6/7)	86% (6/7)
Ortho-CD Vitros	67% (2/3)	33% (1/3)
Abbott Architect	45% (5/11)	18% (2/11)
Thermo Konelab	100% (6/6)	50% (3/6)
<b>TOTAL</b>	<b>84% (54/64)</b>	<b>50% (32/64)</b>
<b>LDL-cholesterol (direct)</b>		
Roche Cobas	100% (4/4)	100% (4/4)
Roche Modular	N/A	N/A
Siemens Vista	100% (4/4)	100% (4/4)
Siemens Advia	N/A	N/A
Beckman DxC	100% (1/1)	100% (1/1)
Beckman AU	100% (3/3)	100% (3/3)
Ortho-CD Vitros	N/A	N/A
Abbott Architect	100% (1/1)	100% (1/1)
Thermo Konelab	100% (3/3)	100% (3/3)
<b>TOTAL</b>	<b>100% (16/16)</b>	<b>100% (16/16)</b>
<b>LDL-cholesterol (calculated)</b>		
Roche Cobas	80% (8/10)	90% (9/10)
Roche Modular	0% (0/1)	100% (1/1)
Siemens Vista	90% (9/10)	90% (9/10)
Siemens Advia	88% (7/8)	100% (8/8)
Beckman DxC	75% (6/8)	88% (7/8)
Beckman AU	100% (7/7)	86% (6/7)
Ortho-CD Vitros	100% (3/3)	100% (3/3)
Abbott Architect	82% (9/11)	91% (10/11)
Thermo Konelab	100% (6/6)	100% (6/6)
<b>TOTAL</b>	<b>86% (55/64)</b>	<b>92% (59/64)</b>

**Table 2: Commutability results of LNE 1 and LNE 2 for TCh, TG, HDL-C, calculated LDL-C and direct LDL-C.**



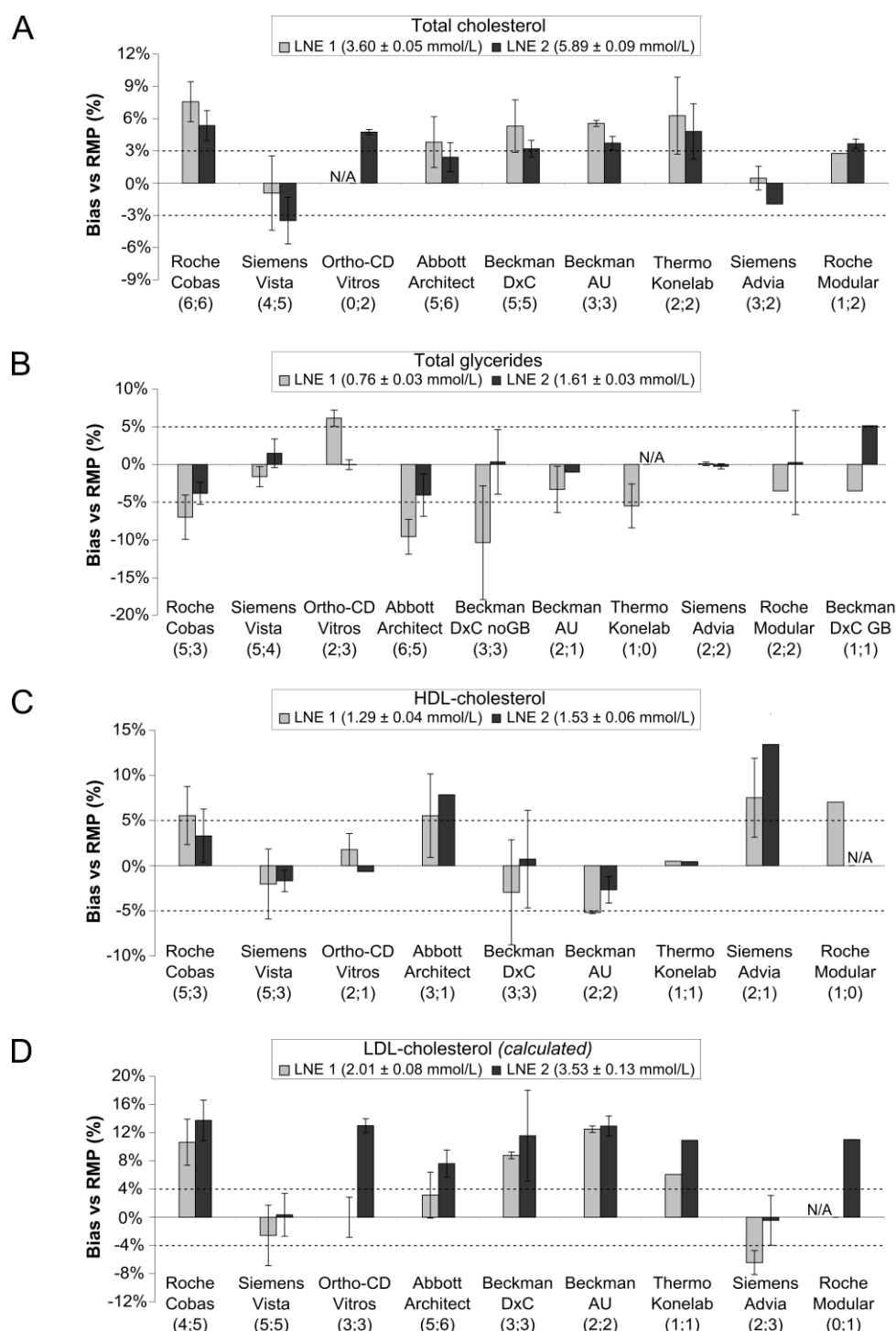
For TCh, LNE1 and LNE2 were found commutable for 81% and 92% of the 37 method combinations, respectively. When commutability was assessed by plotting field method results against IDMS, LNE1 was found commutable for all methods except Roche Modular and Ortho-CD, and LNE2 for all methods except Siemens Vista and Ortho-CD (see detailed results in Supplemental Data S4). Non-commutability of LNE1 and LNE2 for Ortho-CD methods was confirmed by pair-wise comparisons relying on field method combinations. For TG, LNE1 and LNE2 were found commutable for 84 and 77% of the 31 method combinations, respectively. For HDL-C, LNE1 was found commutable for 84% of the 64 method combinations. The figure was only 50% for LNE2, which was found non-commutable for 9 of the 11 combinations involving Abbott methods. For calculated LDL-C, LNE1 and LNE 2 were found commutable for 86% and 92% of the 64 method combinations. For direct LDL-C, LNE materials were found commutable for all of the 16 method combinations.

## **TRUENESS ASSESSMENT OF FIELD METHODS**

Trueness assessment was performed by taking exclusively into account results from field methods for which materials were found commutable.

### ***Total cholesterol***

According to results shown in Figure 3A, most methods overestimated total cholesterol concentration, except Siemens Vista methods, for which a negative bias of -0.9% and -3.5% was measured for the low and high concentration, respectively. Altogether, all of the other methods for which study materials were found commutable averaged a mean bias of +5.0% for LNE1 and +3.2% for LNE2. While only Siemens Advia and Abbott methods met NCEP recommendations (bias  $\leq$  3%)(26) for LNE2, only Roche Modular, Siemens Advia and Siemens Vista methods met NCEP criteria for LNE1. Only Siemens Advia methods met NCEP recommendations for both materials. All other methods failed to meet NCEP criteria for both materials: for Roche Cobas, Beckman DxC, Beckman AU and Thermo KoneLab, bias ranged from +3.2% to +7.6%.



**Figure 3: results of trueness assessment of field methods for which materials were found commutable.**

Error bars represent the standard deviation of biases measured by different laboratories using methods of the same manufacturer. The dotted lines represent the maximum bias recommended by the NCEP. N/A indicate that no material was found to be commutable for the considered method. Methods were represented from left to right as a function of their popularity according to the 2012 French National Quality Control. Numbers in parentheses below manufacturers' names correspond to the number of methods for which LNE1 and LNE2 were found commutable and on which trueness assessment was performed.

### ***Total glycerides***

Altogether, methods for which LNE1 and LNE2 were found commutable averaged a bias of -3.8% for LNE1 (SD=3.4%) and -0.2% for LNE2 (SD=3.0%). While all methods met NCEP criteria for bias (<5%) for the high TG concentration, five of the seven most popular manufacturers' assays had a negative bias above 5% for low TG concentrations, as shown in Figure 3B. Only four methods had a bias of less than 5% for both materials: Siemens Advia, Siemens Vista, Beckman AU and Roche Modular.

### ***HDL-cholesterol***

According to the results shown in Figure 3C, four of the nine methods met NCEP recommendations (bias≤5%) for both materials: Siemens Vista, Ortho-CD, Beckman DxC and Thermo Konelab. Although LNE1 and LNE2 had similar HDL-C concentrations, Beckman AU and Roche Cobas methods had a bias of more than 5% for LNE1 but less than 5% for LNE2. Abbott and Siemens Advia methods failed to meet NCEP criteria for both materials.

### ***LDL-cholesterol calculated by the Friedewald equation***

As shown in Figure 3D, all methods greatly overestimated calculated LDL-C, except Siemens Advia (-6.4% bias for LNE1 and -0.4% for LNE2) and Siemens Vista (-2.6% bias for LNE1 but +0.4% for LNE2). These were the only two methods that met NCEP recommendations (Bias <4%) for LNE2. Only three methods had a bias of less than 4% for LNE1: Siemens Vista (-2.6%), Ortho-CD (0.5%) and Abbott (+1.1%). Bias was above 10% for six of the nine methods on LNE2.

### ***Direct LDL-cholesterol***

Compared with other parameters, trueness assessment of direct LDL-C assays relied on a smaller number of laboratories. As a result, commutability of the LNE's materials could not be assessed for Roche Modular, Siemens Advia and Ortho-CD methods and the results of the trueness assessment are provided as an indication only. As shown in table 3, half of methods met NCEP criteria (bias <4%) for LNE1: Roche Cobas (+1.4%), Roche Modular (-0.2% but commutability not proven), Siemens Vista (-1.6%) and Thermo KoneLab (-3.1%). All of the other methods greatly overestimated LDL-C concentrations and bias ranged from +6.2% (Ortho-CD) to +14.4% (Beckman AU). For LNE2, all of the methods greatly overestimated LDL-C (mean bias of +9.4%) and none of them met NCEP criteria. Bias ranged from +5.6% (Siemens Vista) to +15.8% (Beckman AU) and was above 10% for Beckman DxC (+11.3%), Ortho-CD (+11.9% but commutability not proven) and Abbott (+13.5%).

	LNE L1				LNE L2		
	n	[LDL-C] (mmol/L)	CV (%)	Bias vs RMP (%)	[LDL-C] (mmol/L)	CV (%)	Bias vs RMP (%)
Roche Cobas	2	2.05	2.9%	1.4%	3.76	1.4%	7.8%
Roche Modular	2	2.02	0.2%	-0.2%	3.81	0.2%	9.0%
Siemens Vista	3	2.00	1.3%	-1.6%	3.73	1.8%	5.6%
Beckman DxC	3	2.16	7.0%	7.2%	3.88	0.6%	11.3%
Beckman AU	2	2.31	2.7%	14.4%	4.04	4.7%	15.8%
Ortho-CD Vitros	2	2.15	1.0%	6.2%	3.91	0.8%	11.9%
Abbott Architect	2	2.22	2.1%	10.0%	3.96	2.0%	13.5%
Thermo Konelab	2	1.96	3.0%	-3.1%	3.82	6.8%	9.4%

**Table 3: Results of direct LDL-C measurements**

*Data included all measurements, regardless of results of the commutability assessment. n corresponds to the number of laboratories whose results were used to obtain the mean value [LDL-C] and was compared against the Beta Quantification reference measurement procedure (RMP) to estimate the bias of each manufacturer's peer-group. CV corresponds to the intra-peer group Relative Standard deviation of results*

## Discussion

The results of this study suggest that most of commercial assays tend to greatly overestimate both direct and Friedewald-calculated LDL-C results around the clinical decision-making threshold. This situation would have serious consequences in clinical practice because it would result in false positives that would lead to inappropriate patient stratification and generate unnecessary prescription of costly therapies. This statement therefore calls for the results to be compared with published data and a careful examination of study limitations and their potential consequences on the conclusions drawn.

According to our results, overestimation of calculated LDL-C was due to the combined TCh overestimation, TG underestimation and sometimes HDL-C underestimation, which implies that the consistency of these three data sets should be inspected individually. The positive bias observed for most of TCh assays is consistent with results of three other studies in which method trueness was evaluated against a GC-IDMS RMP (7,27,28). It can be hypothesized that this situation is due to the fact that a significant number of field methods provide results that are traceable to the

Abbell-Kendal (AK) secondary RMP. According to Edwards et al., this method is positively biased against IDMS (29), a primary RMP that is recognized as definitive method for TCh determination. This suggests that a calibration bias could be introduced depending on what reference systems are used to establish traceability chains and monitor assay performance.

Contrary to TCh assays, very few data exist on the performance of TG assays. According to the results of the CDC Lipid Standardization Program (LSP 1st quarter performance 2013) presented during the 2013 AACC congress, a mean bias of about -3% was observed on a frozen serum pool with TG=126 mg/dL (1.4 mmol/L). Four of seven manufacturer's peer groups had a negative bias ranging from -2% to -6%, which is consistent with our results. Moreover, LSP having wider acceptability criteria for bias for low TG concentrations is a good indication that this concentration range might be challenging and is consistent with the larger confidence intervals for commutability obtained for LNE1 (UCI=11.8%) than for LNE2 (UCI=5.7%).

For HDL-C, the most comprehensive study to date, reported by Miller et al (30), compared eight LDL-C direct methods with the BQ RMP. According to this study, the bias of HDL-C assays ranged from -5.4% to +4.8% for the non-diseased group (n=37) and from -8.6% to +8.8% for the diseased group (n=138). The results of our study were in quite good agreement with the data shown in Table 2 of Miller et al. for Siemens Vista, Thermo Konelab, Siemens Advia, Beckman DxC (bias difference < 3.5%) but not for Abbott and Beckman AU (bias difference between 5% and 13.1%).

In the same study, Miller and colleagues also showed that the mean bias eight direct LDL-C methods ranged from -6.8% to +1.1% for the non-diseased group and from -11.8% to +4.1% for the diseased group. According to this study, only two methods had a positive bias for the non-diseased group and one method for the diseased group. Except for three methods that were all markedly negatively biased, the bias of all of the other methods was less than 2% for both groups. The very high biases reported for LDL-C reported in our study were therefore discordant with those reported in Miller et al. and three main hypotheses were made to explain these results: sample-specific effects, lot-to-lot effects and commutability acceptability criteria.

The total CV of LDL-C assays reported by Miller et al. ranged from 2.9% to 6.0% for the non-diseased group and from 6.1% to 16.4% for the diseased group and visual inspection of supplemental data shows that a bias superior to 10-15% was observed for a very significant number of samples in the concentration range close to that of the LNE's materials. Such an important sample-to-sample variability clearly shows that assay performance strongly depends on the properties of the analyzed materials, even though this study was conducted on fresh serum samples that are commutable by definition. Sample-specific effects arise from method non-specificity toward the different lipoprotein subclasses and abnormal lipoproteins, which can itself stem from the difficulty to achieve standardization in lipoprotein testing due to the complexity of the measurand. Important sample-to-sample effects are a challenge in that they make it very difficult to select native samples that are good representatives of the wide variety of clinical specimens

encountered in everyday clinical practice and also to select candidate CRMs that are suitable for trueness assessment or calibration, thus making commutability assessment particularly key.

A major limitation of our study lies in the fact that native samples could not always be measured with a reference method due to insufficient sample volume available and commutability assessment was mostly based on pair-wise comparisons of field method results only, which has some limitations. When pair-wise comparisons included a reference method that was not sensitive to matrix effects (e.g. IDMS RMP for TCh and TG), the matrix bias of the considered sample could be quantitatively determined for a given field method. When both methods were potentially sensitive to matrix effects (e.g. LDL-C and HDL-C direct assays), matrix effects can either compensate or accumulate and conclusions could be misleading. Although providing commutability results as percentages for each manufacturer might hinder a customer's ability to find out whether a given material is suitable to perform reliable trueness assessment or calibration, we found it worthwhile to provide as detailed information as possible on commutability robustness across different platforms of each manufacturer. This is especially true since the results obtained by laboratories using the same analyzer and reagent reference, but with different reagent lots were sometimes discrepant. The potential impact of lot-to-lot effects on commutability results is made credible by the findings of Miller et al., according to 40.9% of reagent lot change–QC events had a significant difference between results for QC samples compared with results for patient samples between 2 reagent lots (31). Since lot changes occur several times per year, the outcomes of a commutability study are potentially very ephemeral and only represent a snapshot of the global performance of assays. Since the commutability of a material is method-dependent, this property should virtually be assessed for every single combination of analyzer, reagent lot and calibrator lot, which is obviously not achievable. Great care should therefore be taken to involve clinical laboratories that are fairly representative of the most popular methods used in practice. Because of the complexity of this study, there was perhaps an insufficient number of laboratories running methods for which the study materials were found commutable and on which assay performance was monitored. While commutability assessment can only involve a small number of participants, trueness assessment should be performed on the largest possible number of laboratories and materials.

Last but not least, a serious issue to be considered is related to the establishment of commutability acceptability criteria that are fit for purpose with respect to the intended use of the material to be qualified. For LNE1 and LNE2, respectively, the acceptability criteria for the maximum allowable matrix bias was 3.9% and 2.9 for TCh, 11.8% and 5.7% for TG, 6.3% and 5.3% for HDL-C, 8.7% and 5.7% for calculated LDL-C, and 8.6% and 4.9% for direct LDL-C. These numbers indicate that uncertainties associated with levels of material commutability are too high compared with the NCEP acceptability criteria for bias used to assess the performance of field methods. This suggests that a purely statistical approach might not be stringent enough depending on the intended use of the material to be qualified. Standardization at the international level is required to

address this point and the creation of an IFCC working group on commutability is expected to help reach a consensus on this challenging issue (32).

## **Conclusion**

This study on the assessment of trueness of commercial assays used by clinical laboratories in routine lipid measurements was very instructive. Commutability assessment is crucial to qualify materials intended for trueness assessments or calibration, but lot-to-lot variations together with sample-to-sample effects make it very difficult to select suitable samples that are fit for purpose and laboratories that are representative of their respective manufacturer's peer group. Whereas commutability assessments of materials for well-defined measurements like total cholesterol and total glycerides appeared to be quite straightforward, this study highlighted the challenge associated with more complex parameters like HDL-C and LDL-C direct assays due to the lack of assay specificity. In all cases, a consensus should be reached to propose international guidelines for the definition of acceptability criteria with respect to the intended use of materials under investigation.

## **Acknowledgements**

We thank all study participants and especially Group A laboratories for successfully selecting, preparing and analyzing a very large number of native samples in a very limited time window. We thank Dr Jacques De Graeve and Jean-Marc Giannoli for their help during the recruitment of participants and study design. We thank Catherine Yardin for her support on the statistical analysis. We thank Philip Bastable and Béatrice Lalere for their thorough re-reading of this article.

## **References :**

1. Prospective Studies Collaboration, Lewington S, Whitlock G, Clarke R, Sherliker P, Emberson J, et al. Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. *Lancet*. 2007;370:1829–39.
2. Cholesterol, diastolic blood pressure, and stroke: 13,000 strokes in 450,000 people in 45 prospective cohorts. Prospective studies collaboration. *Lancet*. 1995;346:1647–53.

3. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972;18:499–502.
4. Nauck M, Warnick GR, Rifai N. Methods for measurement of LDL-cholesterol: A critical assessment of direct measurement by homogeneous assays versus calculation. *Clin Chem.* 2002;48:236–54.
5. Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on In Vitro Diagnostic Medical Device. *Off J Eur Communities L* 331; page 1–37.
6. NF EN ISO 17511 (2003) In vitro diagnostic medical devices -- Measurement of quantities in biological samples -- Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials.
7. Heuillet M, Lalere B, Peignaux M, De Graeve J, Vaslin-Reimann S, Pais De Barros J-P, et al. Validation of a reference method for total cholesterol measurement in human serum and assignation of reference values to proficiency testing samples. *Clin Biochem.* 2013;46:359–64.
8. Miller WG, Myers GL, Rej R. Why Commutability Matters. *Clin Chem.* 2006;52:553–4.
9. Miller WG, Myers GL. Commutability Still Matters. *Clin Chem.* 2013;59:1291–3.
10. Miller WG, Myers GL, Gantzer ML, Kahn SE, Schönbrunner ER, Thienpont LM, et al. Roadmap for Harmonization of Clinical Laboratory Measurement Procedures. *Clin Chem.* 2011;57:1108–17.
11. Vesper HW, Miller WG, Myers GL. Reference Materials and Commutability. *Clin Biochem Rev.* 2007;28:139–47.
12. Vocabulaire international de métrologie - Concepts fondamentaux et généraux et termes associés (VIM). *Guide ISO/CEI 99 : 2007*;
13. NF EN ISO 15194 (2009) In vitro diagnostic medical devices -- Measurement of quantities in samples of biological origin.
14. Miller WG. Specimen materials, target values and commutability for external quality assessment (proficiency testing) schemes. *Clin Chim Acta.* 2003;327:25–37.
15. Delatour V, Lalere B, Saint-Albin K, Peignaux M, Hattchouel J-M, Dumont G, et al. Continuous improvement of medical test reliability using reference methods and matrix-corrected target values in proficiency testing schemes: Application to glucose assay. *Clin Chim Acta.* 2012;413:1872–8.
16. Zegers I, Beetham R, Keller T, Sheldon J, Bullock D, MacKenzie F, et al. The Importance of Commutability of Reference Materials Used as Calibrators: The Example of Ceruloplasmin. *Clin Chem.* 2013;59:1322–9.
17. NCCLS document C37-A. Preparation and validation of commutable frozen human serum pools as secondary reference materials for cholesterol measurement procedures; Approved guidelines. Wayne, PA USA: NCCLS. 1999.



18. BIPM, JCTLM. <http://www.bipm.org/jctlm/> Accessed on June 2012. Available from: <http://www.bipm.org/jctlm/> Accessed on June 2012
19. NF EN ISO 15195 (2004) Laboratory medicine -- Requirements for reference measurement laboratories.
20. NF EN ISO 17025 (2005) General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
21. Bachorik P. Measurement of low-density-lipoprotein cholesterol. In: Rifai N. WG, editor. Handb Lipoprotein Test. AACC; 2000. page 245–63.
22. CDC. Cholesterol Reference Method Laboratory Network (CRMLN) [Internet]. Available from: <http://www.cdc.gov/labstandards/crmln.html>
23. CLSI document C53-A. Characterization and Qualification of Commutable Reference Materials for Laboratory Medicine; Approved guidelines. Wayne, PA, USA. 2010;
24. NPL. XLGENLINE (V1.1) [Internet]. Available from: <http://xlgenline.software.informer.com/1.1/>
25. Kimberly MM, Myers GL, Little RR. Clinical Laboratory Reference Networks. Accreditation Qual Assur. 2004;9:18–23.
26. National Cholesterol Education Program Working Group on Lipoprotein Measurement. Recommendations on lipoprotein measurement. (NIH Publication No. 95-3044): National Institutes of Health; 1995 Sep.
27. Thienpont LM, Stöckl D, Kratochvíla J, Friedecký B, Budina M. Pilot External Quality Assessment Survey for Post-Market Vigilance of In Vitro Diagnostic Medical Devices and Investigation of Trueness of Participants' Results. Clin Chem Lab Med. 2003;41:183–6.
28. Urquiza MP, Mitani Y, Jaimes HON. Proficiency tests to evaluate commercially available IVD kits for glucose and cholesterol measurements. Accreditation Qual Assur. 2009;14:269–71.
29. Edwards SH, Kimberly MM, Pyatt SD, Stribling SL, Dobbin KD, Myers GL. Proposed Serum Cholesterol Reference Measurement Procedure by Gas Chromatography-Isotope Dilution Mass Spectrometry. Clin Chem. 2011;57:614–22.
30. Miller WG, Myers GL, Sakurabayashi I, Bachmann LM, Caudill SP, Dziekonski A, et al. Seven direct methods for measuring HDL and LDL cholesterol compared with ultracentrifugation reference measurement procedures. Clin Chem. 2010;56:977–86.
31. Miller WG, Erek A, Cunningham TD, Oladipo O, Scott MG, Johnson RE. Commutability Limitations Influence Quality Control Results with Different Reagent Lots. Clin Chem. 2011;57:76–83.
32. IFCC commutability [Internet]. Available from: <http://www.ifcc.org/ifcc-scientific-division/sd-working-groups/commutability-wg-c/>

## **Supplemental Data S1: Preparation of LNE CRM Bio101a Level 1 and Level 2 (candidate Certified Reference Materials)**

For each of the two pools, five individual donor units consisting of 450 - 500 mL of whole blood were collected using industry-standard empty blood-bags with integral donor tube, a 15-gauge needle, and a 600-mL plastic container that contained no additives or anticoagulants. Plasma was separated from cells within 15 minutes of unit collection by centrifugation at 1500g for eight minutes at 4°C. The plasma was then transferred to a hard plastic centrifuge bottle for clotting. The plastic centrifuge bottles were incubated at 34° C for four hours to facilitate complete clotting. Serum was separated from the clot by centrifugation and transferred to a plastic vessel until pooled. All single donations were tested and found negative for HBsAg, HIV, and HCV. Pools were mixed in a glass beaker with very gently stirring to avoid foaming for a minimum of three hours at 4° C. While stirring, pure glucose and creatinine were added to the second pool only to reach a final concentration of approximately 12mM and 550µM, respectively. After this step, the pools were allowed to mix overnight to homogeneity. Each pool was then filtered through a hydrophilic polyethersulphone sterile filter (0.22 µm pore size) from Pall laboratories prior to being divided into aliquots. Each pool was aseptically filled into 3mL glass vials. Pools were maintained at 4°C during dispensing. The vials were simultaneously and uniformly frozen to -70 °C and stored at that temperature until shipment. Except during the clotting step, all steps were carried out either on ice or in a refrigerated environment to maintain serum at 4 °C as much as possible to reduce the rate of ammonia formation prior to freezing. The serum was manipulated as aseptically as possible to avoid bacterial contamination. Shipments from the US to France were on dry ice. Samples were received frozen and were stored at -80°C until shipment to the clinical laboratories involved in the commutability study. The homogeneity of each pool was assessed as defined in CLSI C37-A (18): one vial from each of 15 different periods spaced in time equally throughout the filling process were selected and quadruplicate analyses were performed on a Siemens Vista analyzer for all parameters. ANOVA analysis showed that both pools met acceptability criteria. Short-term stability tests were performed to ensure that materials were stable enough.

## Supplemental Data S2: Validation of reference methods

### **Total cholesterol**

TCh reference measurements were obtained according to the procedure described in Heuillet et al. (Clin Biochem. 2013;46(4-5):359-64). Briefly, serum samples were spiked with [3,4-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>] cholesterol and cholesterol esters were saponified by the addition of potassium hydroxide. After complete hydrolysis, cholesterol was extracted and derivatized prior to GC/MS analysis. Results traceability to SI units was achieved by using NIST SRM 911c as the primary calibrator, a certified reference material consisting of purified cholesterol with a certified mass fraction of 99.2 ± 0.4%. The accuracy of the reference method was verified through internal quality controls performed on NIST SRM 1951b (a certified reference material consisting of two pools of frozen human serum) and through two international comparisons: the 2013 CCQM-K6.2 comparison, in which the LNE's results had a bias of +0.09% against NIST certified values and the 2011 IFCC RELA comparison, in which the LNE's results had a bias of +0.08% and -0.66% against the CDC certified values for the two comparison materials, respectively. Bias was -0.42% on NIST SRM 1951b Level 1 (EN=0.2) and +0.36% on NIST SRM 1951b Level 2 (EN=0.3) and imprecision was less than 1% (1.0 and 0.7%, respectively).

Relative bias against NIST and CDC reference values (B) was calculated as follows:  $B = 100 \times (C_{LNE} - C_{ref}) / C_{ref}$ . The normalized deviation EN was calculated by the following formula:

$$E_N = \frac{C_{LNE} - C_{ref}}{\sqrt{u_{LNE}^2 + u_{ref}^2}}$$

where  $C_{LNE}$  is the value obtained by the LNE's reference method,  $C_{ref}$  is the reference value provided by the NIST or the CDC.  $u_{LNE}^2$  et  $u_{ref}^2$  correspond to the expanded measurement uncertainties (coverage factor  $k = 2$ ) associated with  $C_{LNE}$  and  $C_{ref}$ , respectively, and were based on a full uncertainty budget taking into account every source of uncertainty and calculated according to the GUM method. The normalized deviation should be below 2 so that the values are considered not significantly different.

### **Triglycerides**

Total glycerides were measured using a procedure very similar to that described in Edwards et al (Clin Chem. 2012;58(4):768-76) except that NIST SRM 1951b was used as primary the calibrator instead of NIST SRM 1595, and [13C3] triolein was used as the internal standard instead of [13C3] glycerol. The accuracy of the LNE's RMP was validated through confirmation measurements

performed at the CDC on the LNE's candidate CRMs. Internal quality controls were also performed on NIST SRM 909c, a certified reference material consisting in frozen human serum. Bias of the LNE's reference method was +0.96% on NIST SRM 909c ( $E_N=0.8$ ) and imprecision was 0.8%. Confirmation measurements performed at the CDC provided results very close to the LNE's certified values for both materials: bias was -0.10% for LNE1 ( $E_N=0.1$ ) and +0.42% for LNE2 ( $E_N=0.3$ ).

### ***Beta-quantification***

Serum samples (2mL) were overlaid by 500  $\mu$ L of a 0.195 mmol/L NaCl solution and ultracentrifuged for 4h30 at 540600g at  $d = 1.006$  kg/L to separate the supernatant, which contained triglyceride-rich lipoproteins (VLDL and chylomicron), from the infranate, which contained LDL and HDL. Cholesterol was measured by GC-IDMS in the infranate fraction to provide the sum of LDL and HDL cholesterol. ApoB containing lipoproteins from the infranate were then precipitated by heparin–manganese chloride (SOURCE) and HDL cholesterol in the remaining supernatant was measured by GC-IDMS. The LDL-C value was deduced by subtracting the HDL-C value from the total cholesterol value of the bottom fraction. To validate the accuracy of the LNE's reference measurement procedures, confirmation measurements were performed at the CDC on the LNE's candidate CRMs. For LDL-C and HDL-C, confirmation measurements performed at the CDC provided results very close to the LNE's certified values for both materials. For HDL-C, the LNE's results had a bias of +0.85% against those from the CDC ( $E_N = 0.1$ ) for LNE1 and -0.02% for LNE2 ( $E_N < 0.1$ ). Imprecision was 1.3 and 1.9%, respectively. For LDL-C, the LNE's results had a bias of -0.01% against those from the CDC ( $E_N = 0.1$ ) for LNE1 and +1.31% for LNE2 ( $E_N = 0.3$ ). Imprecision was 1.9 and 1.8%, respectively.

## Supplemental Data S3: statistical treatment for commutability assessment

The commutability of study materials was assessed according to CLSI-C53A guidelines to determine whether the candidate CRMs under investigation behaved like fresh serum samples. For each parameter, analysis was based on pair-wise comparisons by plotting mean values of two different methods that were used to analyse the same samples. In the first phase of the study, the results for total cholesterol and total glycerides obtained by clinical laboratories were only plotted against those provided by the IDMS reference methods (e.g. A20 vs. IDMS, B20 vs. IDMS, etc...), leading to seven different pairs. For HDL-C and calculated LDL-C, all possible combinations led to the generation of 18 different pairs (e.g. A20B20, A20C21, B21B22, etc...). For direct LDL-C, only results from laboratories using a direct method were combined. This resulted in six different combinations. When the results of the two field methods were plotted against each other (measurement of LDL-C and HDL-C in both phases and measurements of total cholesterol and total glycerides in the second phase), the results obtained by laboratory Ai were plotted against those of the associated laboratory 2 to assess material commutability for the method used by laboratory Ai with method Bi taken as the reference. The results obtained by laboratory Bi were then plotted against those of the associated laboratory Ai to assess material commutability for the method used by laboratory Ai with method Bi taken as the reference. Each method pair therefore generated two separate data sets. This procedure was applied to the results obtained by the 15 pairs of laboratories involved in the second phase of the study, in which only field method results were pair-wise combined, leading to 30 combinations.

For each analyte, the typical behaviour of native samples for a given combination of methods was determined by establishing the Deming regression line and the associated 95% confidence interval. The Deming regression line was established with XLGENLINE software by using a Generalized Least Squares model (GLS). Standard measurement uncertainty associated with the mean value of each sample was taken as the standard deviation of the field method results obtained from the triplicate analysis. For reference values, measurement uncertainty was calculated according to the GUM method by using method validation data.

On the basis of the Deming regression line established with the 21-25 native samples, the results from method B ( $C_{B\_obs}$ ) were expressed as a function of those from method A ( $C_{A\_obs}$ ):  $C_{B\_obs} = a_1 \times C_{A\_obs} + b_0$ . For each sample, a modelled concentration  $C_{B\_Mod}$  was calculated from the concentration measured by method B ( $C_{B\_obs}$ ):  $C_{A\_Mod} = (C_{B\_obs} - b_0) / a_1$ .  $C_{A\_Mod}$  corresponds to the theoretical concentration that would be measured by method A if the considered sample had a behaviour identical to the average behaviour observed on the global set of 21-25 native samples when method B was taken as the reference (i.e. by simulating matrix effects on method B results). Method B is typically a reference method that is not sensitive to matrix effects. The matrix bias MB of a given sample was defined as the relative difference between its modelled concentration and its

concentration measured by method A in practice:  $MB (\%) = (C_{A\_obs} - C_{A\_Mod}) / C_{A\_Mod}$ . The matrix bias was calculated for the candidate CRMs and for all native samples with the objective to estimate uncertainties arising from the scattering of native samples around the regression line. By definition, the mean matrix bias of the global set of native samples is null. Standard uncertainty associated with the matrix bias of each individual native sample ( $u_{MB\_indiv}$ ) was first calculated as follows:  $u_{MB\_indiv} = (C_{A\_obs} - C_{A\_Mod}) / \sqrt{3}$ . The standard uncertainty associated with the mean matrix bias of the complete set of n native samples ( $u_{MB}$ ) was then calculated as follows:

$$u_{MB} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n u_{MB\_indiv}^2}{n}}$$

The associated 95% confidence interval was determined locally by calculating the maximum allowable matrix bias  $U_{CI}$  above which a given sample was considered to be non-commutable.  $U_{CI}$  was calculated as follows:

$$U_{CI} = k \times \sqrt{u_{MB}^2 + u_{A\_Mod}^2}$$

where  $u_{A\_Mod}$  is the standard uncertainty associated with  $C_{A\_Mod}$  determined by the XLGENLINE software and k is a coverage factor taken as k=2 to obtain a 95% confidence interval. Relative  $U_{CI}$  was calculated for each sample with a modelled concentration  $C_{A\_Mod}$  by the following equation:  $U_{CI} (\%) = U_{CI} / C_{A\_Mod}$ . The conclusion on the commutability of the candidate CRMs for method A was drawn by comparing matrix bias against the maximum allowable matrix bias  $U_{CI}$ .

## Supplemental Data S4: commutability results

### S4.1. Total cholesterol

Analyzer	Lab	Reagent reference	Reagent lot	Calibrator reference	Calibrator lot	Twin Lab	R <sup>2</sup>	LNE 1			LNE 2		
								Matrix bias (%)	U <sub>CL</sub> (%)	commutable?	Matrix bias (%)	U <sub>CL</sub> (%)	commutable?
Roche Cobas c701	A2	3039773	N/A	N/A	N/A	B2	0.9988	0.6%	3.8%	yes	-0.5%	1.6%	yes
Roche Cobas c701	B6	5168538	671602	N/A	163942	A6	0.9882	-1.9%	4.8%	yes	-1.2%	3.4%	yes
Roche Cobas c701	A9	5168538	N/A	N/A	N/A	B9	0.9923	1.4%	5.4%	yes	2.8%	2.9%	yes
Roche Cobas c701	A10	3039773	675483	N/A	163942	B10	0.9982	4.5%	2.2%	no	3.1%	3.6%	yes
Roche Cobas c501	A16	3039773	N/A	N/A	N/A	B16	0.998	-0.5%	3.0%	yes	-2.0%	1.5%	no
Roche Cobas c501	A19	N/A	N/A	N/A	N/A	LNE	0.9963	-3.2%	3.4%	yes	-2.7%	2.9%	yes
Roche Cobas c701	B22	5168538	675255	1075935090	163942	LNE	0.992	-1.1%	3.4%	yes	0.1%	2.7%	yes
Roche Modular	A4	11491458	674467	CFAS	163942	LNE	0.9936	4.5%	3.9%	no	-0.9%	2.9%	yes
Roche Modular	B8	11491458	674467	CFAS	163942	A8	0.9915	-3.2%	3.8%	yes	0.3%	2.5%	yes
Siemens Vista	A1	K1027	12192BD	N/A	2BM081	B1	0.9906	8.8%	4.9%	no	-0.5%	3.1%	yes
Siemens Vista	A3	K1027	N/A	N/A	N/A	B3	0.9971	-0.8%	2.3%	yes	-0.4%	1.5%	yes
Siemens Vista	A7	K1027	12264 AA	KC110	2DM081	B7	0.9877	-0.6%	4.6%	yes	-0.3%	3.8%	yes
Siemens Vista	B10	K1027	12123 BB	N/A	2BM081	A10	0.9982	-4.3%	2.8%	no	-3.0%	3.3%	yes
Siemens Vista	A11	K1027	12192BD	N/A	2BM081	B11	0.9846	1.8%	6.3%	yes	-0.2%	3.8%	yes
Siemens Vista	C22	N/A	N/A	N/A	N/A	LNE	0.9885	1.2%	4.6%	yes	-3.7%	3.3%	no
Siemens Advia 1800	B14	10376501	255585	9784096	90445	A14	0.9977	2.3%	2.9%	yes	-1.1%	2.5%	yes
Siemens Advia 1800	B16	10376596	N/A	N/A	269961	A16	0.998	0.5%	2.3%	yes	2.1%	2.1%	no
Siemens Advia 1800	A20	4993681	26956	9784096	98590c	LNE	0.9964	0.8%	2.9%	yes	0.0%	2.4%	yes
Beckman DxC 800	A8	467825	206103	Multical	M110178	B8	0.9915	3.3%	6.5%	yes	-0.3%	2.4%	yes
Beckman DxC 600	B9	467825	T204150	Multical	M110178	A9	0.9923	-1.4%	4.4%	yes	-2.8%	3.1%	yes
Beckman DxC 800	B11	457825	208015	Multical	M110178	A11	0.9846	-1.7%	7.0%	yes	0.2%	4.1%	yes
Beckman DxC 800	A17	467825	T208015	Multical	M110178	B18	0.9913	-1.7%	6.2%	yes	-2.9%	2.9%	yes
Beckman DxC 800	B21	N/A	N/A	N/A	N/A	LNE	0.9892	2.2%	4.4%	yes	-2.1%	3.2%	yes
Beckman AU 2700	A6	OSR 6216	2204	66300	115	B6	0.9882	2.0%	4.8%	yes	1.3%	4.1%	yes
Beckman AU 680	B7	OSR6216	3579	66300	116	A7	0.9877	0.6%	4.5%	yes	0.3%	3.1%	yes
Beckman AU 680	C20	OSR6216	3579	OE66300	116A	LNE	0.9919	1.2%	3.8%	yes	0.5%	2.9%	yes
Ortho-CD Vitros 5,1 FS	B1	166-9829	N/A	N/A	N/A	A1	0.9906	-7.0%	3.8%	no	0.4%	3.2%	yes
Ortho-CD Vitros 5,1 FS	B15	166-9829	N/A	N/A	N/A	A15	0.9965	-4.6%	2.4%	no	-1.0%	1.6%	yes
Ortho-CD Vitros 5600	B19	166-9629	N/A	N/A	N/A	LNE	0.9945	-6.2%	4.2%	no	-3.6%	3.0%	no
Abbott c8000	B2	7D62-21	94727UN12	1E65-05	11110Y700	A2	0.9988	-0.6%	3.3%	yes	0.6%	1.8%	yes

Abbott c16000	B3	7D62-21	13793CN12	1E65-05	11110Y700	A3	0.9971	0.8%	3.0%	yes	0.4%	1.3%	yes
Abbott c8000	B4	7D62-21	94727UN12	1E65-05	11110Y700	LNE	0.9957	0.8%	3.3%	yes	-2.2%	2.6%	yes
Abbott c8000	A14	7D62-21	94727UN12	1E65-05	11110Y700	B14	0.9977	-2.2%	2.8%	yes	1.5%	2.1%	yes
Abbott c8000	A15	7D62-21	23876UN12	1E65-05	11110Y700	B15	0.9965	5.0%	3.0%	no	0.8%	2.5%	yes
Abbott c8000	B20	7D62-21	56557UN12	1E65-05	11110Y700	LNE	0.9924	0.0%	3.5%	yes	-0.4%	2.7%	yes
Konelab 20/i	B18	N/A	N/A	N/A	N/A	A17	0.9913	1.7%	3.6%	yes	2.9%	4.5%	yes
Konelab	C21	N/A	N/A	N/A	N/A	LNE	0.9908	-1.5%	4.0%	yes	-1.0%	3.0%	yes



## S4.2. Triglycerides

Analyzer	Lab	Reagent reference	Reagent lot	Calibrator reference	Calibrator lot	Twin Lab	R <sup>2</sup>	LNE 1			LNE 2		
								Matrix bias (%)	U <sub>CI</sub> (%)	commutable?	Matrix bias (%)	U <sub>CI</sub> (%)	commutable?
Roche Cobas c701	A2	20767107	N/A	N/A	N/A	B2	0.9963	8.1%	8.3%	yes	3.0%	3.8%	yes
Roche Cobas c701	A9	5171407	N/A	N/A	N/A	B9	0.9983	-3.2%	7.5%	yes	-2.5%	4.7%	yes
Roche Cobas c501	A16	20767107	671262	N/A	N/A	B16	0.9997	-4.3%	4.5%	yes	-9.6%	2.0%	no
Roche Cobas c501	A19	N/A	N/A	N/A	N/A	B19	0.9898	-5.6%	12.0%	yes	4.8%	6.0%	yes
Roche Cobas c701	B22	5171407	673385	10759350190	163942	LNE	0.9875	4.4%	14.2%	yes	7.8%	7.4%	no
Roche Modular	A4	11730711	661752	CFAS	163942	B4	0.9976	16.8%	16.6%	no	1.8%	6.0%	yes
Roche Modular	B8	11730711	670083	CFAS	163942	A8	0.9946	-9.9%	15.4%	yes	-1.8%	7.5%	yes
Siemens Vista	A1	K2069	122 82BF	N/A	2CM001	B1	0.9873	-5.2%	10.5%	yes	-0.6%	5.3%	yes
Siemens Vista	A3	K2069	N/A	N/A	N/A	B3	0.9975	6.3%	11.0%	yes	0.6%	6.0%	yes
Siemens Vista	A7	K2069	122 82BF	KC120	2JM001	B7	0.9984	1.1%	5.4%	yes	2.3%	2.3%	yes
Siemens Vista	A11	K2069	122 08BF	N/A	2AM001	B11	0.9924	0.6%	15.2%	yes	3.7%	6.9%	yes
Siemens Vista	C22	N/A	N/A	N/A	N/A	LNE	0.9879	6.8%	14.1%	yes	8.4%	7.3%	no
Siemens Advia 1800	B14	9580156	229649	9784096	90445	A14	0.9906	3.4%	8.3%	yes	0.9%	4.0%	yes
Siemens Advia 1800	B16	9580156	N/A	N/A	247231	A16	0.9997	4.5%	4.0%	no	10.6%	2.8%	no
Siemens Advia 1800	A20	9580156	273200	9784096	98590c	LNE	0.9843	14.7%	16.8%	yes	7.6%	8.3%	yes
Beckman DxC 800	A8	44850	210050	Multical	M110178	B8	0.9946	14.3%	22.4%	yes	2.1%	8.5%	yes
Beckman DxC 600	B9	445850	T204011	Multical	M110178	A9	0.9983	4.1%	9.9%	yes	2.8%	4.9%	yes
Beckman DxC 800	B11	445850	209041	Multical	M110178	A11	0.9924	-0.7%	18.2%	yes	-3.8%	7.5%	yes
Beckman DxC 800	B21	N/A	N/A	N/A	N/A	LNE	0.9847	10.0%	17.4%	yes	6.9%	8.3%	yes
Beckman AU 680	B7	OSR61118	3559	66300	116	A7	0.9984	-1.1%	8.4%	yes	-2.2%	2.4%	yes
Beckman AU 680	C20	OSR61118	4167	OE66300	116A	LNE	0.9839	8.4%	15.9%	yes	8.1%	8.0%	no
Ortho-CD Vitros 5,1 FS	B1	133-6544	N/A	N/A	N/A	A1	0.9873	5.6%	14.8%	yes	0.6%	5.5%	yes
Ortho-CD Vitros 5,1 FS	B15	133-6544	N/A	N/A	N/A	A15	0.993	13.0%	10.7%	no	1.5%	4.3%	yes
Ortho-CD Vitros 5600	B19	133-6544	N/A	N/A	N/A	A19	0.9898	6.1%	12.9%	yes	-4.6%	7.6%	yes
Abbott c8000	B2	7D74-21	85499UN12	N/A	11110Y700	A2	0.9963	-8.0%	8.2%	yes	-3.0%	4.4%	yes
Abbott c16000	B3	7D74-21	85499UN12	1E6505	11110Y700	A3	0.9975	-5.3%	8.5%	yes	-0.6%	4.9%	yes
Abbott c8000	B4	7D7421	16199UN12	1E6505	11110Y700	A4	0.9976	-11.8%	11.3%	no	-1.6%	6.4%	yes
Abbott c8000	A14	7D7421	16199UN12	1E6505	11110Y700	B14	0.9906	-3.5%	8.4%	yes	-0.9%	4.0%	yes
Abbott c8000	A15	7D74-21	19199UN12	1E6505	11110Y700	B15	0.993	-10.6%	7.8%	no	-1.4%	3.9%	yes
Abbott c8000	B20	7D74-21	74814UN12	1E6505	11110Y700	LNE	0.9874	6.0%	13.9%	yes	7.4%	7.3%	no
Konelab	C21	N/A	N/A	N/A	N/A	LNE	0.9901	7.3%	13.4%	yes	9.2%	7.1%	no

### S4.3. HDL-cholesterol

Analyzer	Lab	Reagent reference	Reagent lot	Calibrator reference	Calibrator lot	Twin Lab	R <sup>2</sup>	LNE 1			LNE 2		
								Matrix bias (%)	U <sub>CI</sub> (%)	commutable?	Matrix bias (%)	U <sub>CI</sub> (%)	commutable ?
Roche Cobas c701	A2	5168805	N/A	N/A	N/A	B2	0.9911	-3.1%	4.8%	yes	-3.9%	4.8%	yes
Roche Cobas c701	A9	5168805	N/A	N/A	N/A	B9	0.9703	5.2%	6.8%	yes	-2.8%	6.8%	yes
Roche Cobas c501	A16	N/A	4399803	N/A	660687	B16	0.9617	-0.7%	6.1%	yes	-7.0%	4.7%	no
Roche Cobas c501	A19	N/A	N/A	N/A	N/A	B19	0.9406	-7.6%	11.1%	yes	-11.3%	9.1%	no
Roche Cobas c701	B22	5168805	668540	12172623122	166519	A20	0.9836	-0.2%	6.9%	yes	-3.6%	5.3%	yes
Roche Cobas c701	B22	5168805	668540	12172623122	166519	B20	0.9889	-6.0%	6.5%	yes	-9.3%	4.5%	no
Roche Cobas c701	B22	5168805	668540	12172623122	166519	B21	0.9953	-1.4%	6.2%	yes	-6.7%	3.1%	no
Roche Cobas c701	B22	5168805	668540	12172623122	166519	C20	0.9811	0.1%	6.9%	yes	-3.3%	6.7%	yes
Roche Cobas c701	B22	5168805	668540	12172623122	166519	C21	0.9959	-0.4%	3.9%	yes	0.0%	3.3%	yes
Roche Cobas c701	B22	5168805	668540	12172623122	166519	C22	0.9957	1.6%	4.2%	yes	1.2%	4.8%	yes
Roche Modular	A4	4713109	660662	CFAS lipides	166519	B4	0.979	-5.4%	6.2%	yes	-7.4%	4.8%	no
Siemens Vista	A1	K3048A	12187 AA	N/A	2HK086	B1	0.9747	5.8%	8.7%	yes	8.0%	7.4%	no
Siemens Vista	A3	K3048A	N/A	N/A	N/A	B3	0.9311	-7.4%	7.6%	yes	-7.8%	7.0%	no
Siemens Vista	A7	K3048A	12277 AA	KC220A	2JK087	B7	0.9677	1.2%	6.4%	yes	-3.1%	4.0%	yes
Siemens Vista	A11	K3048A	12187AA	N/A	2GK085	B11	0.9879	6.0%	7.2%	yes	-2.2%	5.3%	yes
Siemens Vista	C22	N/A	N/A	N/A	N/A	A20	0.9903	-2.5%	5.9%	yes	-6.0%	4.5%	no
Siemens Vista	C22	N/A	N/A	N/A	N/A	B20	0.992	-7.7%	5.8%	no	-10.8%	3.9%	no
Siemens Vista	C22	N/A	N/A	N/A	N/A	B21	0.9956	-2.7%	6.1%	yes	-7.5%	2.9%	no
Siemens Vista	C22	N/A	N/A	N/A	N/A	B22	0.9957	-1.5%	5.5%	yes	-1.1%	5.4%	yes
Siemens Vista	C22	N/A	N/A	N/A	N/A	C20	0.9905	-1.1%	4.9%	yes	-4.2%	5.4%	yes
Siemens Vista	C22	N/A	N/A	N/A	N/A	C21	0.9958	-1.2%	4.3%	yes	-0.2%	3.6%	yes
Siemens Advia 1800	B14	7511947	244543	309530	253688	A14	0.9757	-9.2%	5.3%	no	-9.5%	4.3%	no
Siemens Advia 1800	B16	7511947	N/A	N/A	255597	A16	0.9617	0.6%	5.2%	yes	6.5%	6.0%	no
Siemens Advia 1800	A20	6521559	264859	309530	321ch	B20	0.9908	-5.9%	6.0%	yes	-6.0%	4.2%	no
Siemens Advia 1800	A20	6521559	264859	309530	321ch	B21	0.9912	-1.2%	6.9%	yes	-3.4%	4.0%	yes
Siemens Advia 1800	A20	6521559	264859	309530	321ch	B22	0.9836	0.2%	7.6%	yes	3.6%	7.0%	yes
Siemens Advia 1800	A20	6521559	264859	309530	321ch	C20	0.9934	0.3%	4.2%	yes	0.3%	4.9%	yes
Siemens Advia 1800	A20	6521559	264859	309530	321ch	C22	0.9903	2.5%	5.8%	yes	6.1%	5.8%	no
Siemens Advia 1800	A20	6521559	264859	309530	321ch	C21	0.9851	1.5%	7.2%	yes	4.3%	6.0%	yes
Beckman DxC 600	B9	650207	T207123	Lipid Cal	M110130	A9	0.9703	-4.4%	5.7%	yes	2.6%	6.5%	yes
Beckman DxC 800	B11	650207	211037	Lipid Cal	M110131	A11	0.9879	-5.1%	5.7%	yes	2.0%	5.8%	yes
Beckman DxC 800	B21	N/A	N/A	N/A	N/A	A20	0.9912	-2.1%	6.0%	yes	0.1%	4.6%	yes
Beckman DxC 800	B21	N/A	N/A	N/A	N/A	B20	0.9906	-4.3%	6.3%	yes	-2.9%	4.3%	yes

Beckman DxC 800	B21	N/A	N/A	N/A	N/A	B22	0.9953	1.5%	5.8%	yes	7.2%	5.6%	no
Beckman DxC 800	B21	N/A	N/A	N/A	N/A	C20	0.9897	2.5%	5.6%	yes	4.5%	5.9%	yes
Beckman DxC 800	B21	N/A	N/A	N/A	N/A	C21	0.994	1.4%	5.2%	yes	8.0%	4.4%	no
Beckman DxC 800	B21	N/A	N/A	N/A	N/A	C22	0.9956	2.8%	4.3%	yes	8.1%	4.9%	no
Beckman AU 680	B7	OSR6287	3919	ODC0011	29	A7	0.9677	-1.1%	4.6%	yes	2.9%	3.5%	yes
Beckman AU 680	C20	OSR6287	4343	ODC0011	30A	A20	0.9934	-0.2%	4.3%	yes	-0.2%	3.2%	yes
Beckman AU 680	C20	OSR6287	4343	ODC0011	30A	B20	0.9917	-5.8%	5.3%	no	-5.9%	3.7%	no
Beckman AU 680	C20	OSR6287	4343	ODC0011	30A	B21	0.9852	-2.1%	8.0%	yes	-3.8%	5.4%	yes
Beckman AU 680	C20	OSR6287	4343	ODC0011	30A	B22	0.9811	-0.1%	7.5%	yes	3.1%	6.8%	yes
Beckman AU 680	C20	OSR6287	4343	ODC0011	30A	C21	0.981	0.1%	7.5%	yes	4.5%	6.4%	yes
Beckman AU 680	C20	OSR6287	4343	ODC0011	30A	C22	0.9835	1.3%	7.0%	yes	4.3%	6.7%	yes
Ortho-CD Vitros 5,1 FS	B1	680-2469	N/A	N/A	N/A	A1	0.9747	-5.6%	9.4%	yes	-7.5%	9.0%	yes
Ortho-CD Vitros 5,1 FS	B15	680-1895	N/A	N/A	N/A	A15	0.9805	-8.1%	6.2%	no	-9.9%	4.7%	no
Ortho-CD Vitros 5600	B19	680-2469	N/A	N/A	N/A	A19	0.9406	6.5%	11.5%	yes	10.4%	8.3%	no
Abbott c8000	B2	3K33-21	87100Y830	N/A	13495 M500	A2	0.9911	2.8%	5.2%	yes	3.7%	4.4%	yes
ABBOTT c16000	B3	3K33-21	84983Y830	1E6803	07343 M500	A3	0.9311	7.3%	8.0%	yes	7.8%	6.9%	no
Abbott c8000	B4	3K33-21	87100Y830	1E6803	13495 M500	A4	0.979	5.4%	7.7%	yes	7.7%	5.5%	no
Abbott c8000	A14	3K33-21	87100Y830	1E6803	15282 M500	B14	0.9757	8.9%	4.9%	no	9.5%	4.1%	no
Abbott c8000	A15	3K33-21	87100Y830	1E6803	04015M500	B15	0.9805	8.4%	5.6%	no	10.6%	5.7%	no
Abbott c8000	B20	3K33-21	65003Y880	1E6803	04015M500	A20	0.9908	6.4%	5.6%	no	6.2%	4.2%	no
Abbott c8000	B20	3K33-21	65003Y880	1E6803	04015M500	B21	0.9906	4.4%	6.7%	yes	3.0%	3.9%	yes
Abbott c8000	B20	3K33-21	65003Y880	1E6803	04015M500	B22	0.9889	6.2%	6.7%	yes	10.1%	6.3%	no
Abbott c8000	B20	3K33-21	65003Y880	1E6803	04015M500	C20	0.9917	6.6%	4.5%	no	6.7%	5.1%	no
Abbott c8000	B20	3K33-21	65003Y880	1E6803	04015M500	C21	0.989	6.4%	5.6%	no	10.8%	4.8%	no
Abbott c8000	B20	3K33-21	65003Y880	1E6803	04015M500	C22	0.992	8.1%	5.0%	no	11.8%	5.3%	no
Konelab	C21	N/A	N/A	N/A	N/A	A20	0.9851	-3.1%	7.6%	yes	-6.5%	5.9%	no
Konelab	C21	N/A	N/A	N/A	N/A	B20	0.989	-6.5%	6.7%	yes	-10.4%	4.7%	no
Konelab	C21	N/A	N/A	N/A	N/A	B21	0.994	-1.5%	7.3%	yes	-7.9%	4.0%	no
Konelab	C21	N/A	N/A	N/A	N/A	B22	0.9959	0.4%	5.8%	yes	0.0%	5.6%	yes
Konelab	C21	N/A	N/A	N/A	N/A	C20	0.9845	0.2%	7.1%	yes	-4.8%	6.9%	yes
Konelab	C21	N/A	N/A	N/A	N/A	C22	0.9958	1.3%	4.7%	yes	0.2%	5.2%	yes

#### S4.4. LDL-cholesterol (direct)

Analyzer	Lab	Reagent reference	Reagent lot	Calibrator reference	Calibrator lot	Twin Lab	R <sup>2</sup>	LNE 1			LNE 2		
								Matrix bias (%)	U <sub>CI</sub> (%)	commutable ?	Matrix bias (%)	U <sub>CI</sub> (%)	commutable ?
Roche Cobas c701	A9	4714423	N/A	N/A	N/A	B9	0.9688	4.0%	11.5%	yes	-3.6%	6.0%	yes
Roche Cobas c701	B22	5171369	664935	12172623122	166519	C20	0.9882	5.2%	7.5%	yes	1.9%	3.8%	yes
Roche Cobas c701	B22	5171369	664935	12172623122	166519	C21	0.9952	0.8%	4.5%	yes	1.7%	4.1%	yes
Roche Cobas c701	B22	5171369	664935	12172623122	166519	C22	0.9698	-0.2%	9.9%	yes	-1.8%	5.1%	yes
Siemens Vista	A3	K3131	N/A	N/A	N/A	B3	0.9901	-3.0%	6.9%	yes	1.8%	3.9%	yes
Siemens Vista	C22	N/A	N/A	N/A	N/A	B22	0.9697	0.1%	9.2%	yes	1.8%	5.2%	yes
Siemens Vista	C22	N/A	N/A	N/A	N/A	C20	0.9716	2.7%	12.2%	yes	0.2%	6.4%	yes
Siemens Vista	C22	N/A	N/A	N/A	N/A	C21	0.9798	-1.0%	8.2%	yes	3.2%	5.5%	yes
Beckman DxC 600	B9	969706	202001	LDL cal	M202001	A9	0.9688	-3.7%	10.9%	yes	3.7%	6.7%	yes
Beckman AU 680	C20	OSR6183	3842	ODC0012	35A	B22	0.9882	-4.0%	6.1%	yes	-1.7%	3.8%	yes
Beckman AU 680	C20	OSR6183	3842	ODC0012	35A	C21	0.9894	-2.3%	7.1%	yes	2.1%	5.1%	yes
Beckman AU 680	C20	OSR6183	3842	ODC0012	35A	C22	0.9716	-2.3%	10.3%	yes	-0.2%	5.9%	yes
ABBOTT c16000	B3	1E31-20	N/A	N/A	834915	A3	0.9901	3.2%	7.9%	yes	-1.8%	4.3%	yes
Konelab	C21	N/A	N/A	N/A	N/A	B22	0.9952	-0.7%	5.7%	yes	-1.8%	3.2%	yes
Konelab	C21	N/A	N/A	N/A	N/A	C20	0.9894	3.1%	9.8%	yes	-2.4%	4.8%	yes
Konelab	C21	N/A	N/A	N/A	N/A	C22	0.9798	1.2%	10.0%	yes	-3.4%	5.0%	yes

#### S4.5. LDL-cholesterol (calculated)

Analyzer	Lab	Twin Lab	R <sup>2</sup>	LNE 1			LNE 2		
				Matrix bias (%)	U <sub>CI</sub> (%)	commutable ?	Matrix bias (%)	U <sub>CI</sub> (%)	commutable ?
Roche Cobas c701	A2	B2	0.9976	0.60%	6.50%	yes	-0.40%	2.30%	yes
Roche Cobas c701	A9	B9	0.9648	-8.50%	12.00%	yes	2.40%	7.20%	yes
ROCHE COBAS c501	A16	B16	0.9923	6.80%	6.10%	no	0.40%	3.10%	yes
ROCHE COBAS c501	A19	B19	0.9709	4.20%	11.20%	yes	3.60%	8.20%	yes
Roche Cobas c701	B22	A20	0.9873	-3.70%	5.80%	yes	2.40%	3.50%	yes
Roche Cobas c701	B22	B20	0.9866	0.30%	7.30%	yes	5.30%	3.50%	no
Roche Cobas c701	B22	B21	0.9716	-8.60%	8.60%	no	5.10%	6.70%	yes
Roche Cobas c701	B22	C20	0.9738	-5.80%	8.80%	yes	0.60%	6.50%	yes
Roche Cobas c701	B22	C21	0.9923	0.30%	6.50%	yes	1.80%	3.70%	yes
Roche Cobas c701	B22	C22	0.9835	-6.90%	9.40%	yes	6.40%	9.60%	yes
Roche Modular	A4	B4	0.9917	9.50%	6.30%	no	4.40%	6.80%	yes
Siemens Vista	A1	B1	0.9733	5.80%	10.10%	yes	-3.40%	5.80%	yes
Siemens Vista	A3	B3	0.983	4.60%	8.80%	yes	-4.20%	4.70%	yes
Siemens Vista	A7	B7	0.9793	-2.80%	9.20%	yes	-1.90%	6.60%	yes
Siemens Vista	A11	B11	0.9838	-3.70%	10.30%	yes	-2.90%	5.60%	yes
Siemens Vista	C22	A20	0.9876	5.00%	7.60%	yes	-3.90%	4.20%	yes
Siemens Vista	C22	B20	0.9875	9.30%	9.50%	yes	-1.60%	4.30%	yes
Siemens Vista	C22	B21	0.9823	-1.60%	9.30%	yes	-1.30%	7.10%	yes
Siemens Vista	C22	B22	0.9835	8.90%	9.20%	yes	-6.60%	4.60%	no
Siemens Vista	C22	C20	0.9803	2.70%	10.90%	yes	-5.10%	7.40%	yes
Siemens Vista	C22	C21	0.9883	10.50%	10.10%	no	-3.90%	5.20%	yes
Siemens Advia 1800	B14	B14	0.9799	1.80%	8.80%	yes	-0.30%	5.90%	yes
Siemens Advia 1800	B16	B16	0.9923	-5.90%	5.90%	no	-0.30%	2.90%	yes
Siemens Advia 1800	A20	B20	0.9862	4.10%	9.60%	yes	4.60%	4.70%	yes
Siemens Advia 1800	A20	B21	0.9755	-6.90%	10.00%	yes	3.70%	7.40%	yes
Siemens Advia 1800	A20	B22	0.9873	4.40%	7.50%	yes	-2.50%	3.80%	yes
Siemens Advia 1800	A20	C20	0.9721	-5.20%	11.00%	yes	-3.30%	7.50%	yes
Siemens Advia 1800	A20	C22	0.9876	-4.50%	10.10%	yes	4.00%	10.10%	yes
Siemens Advia 1800	A20	C21	0.9941	6.00%	8.30%	yes	1.50%	4.40%	yes
Beckman DxC 600	B9	A9	0.9648	10.90%	13.60%	yes	-2.50%	7.60%	yes
Beckman DxC 800	B11	A11	0.9838	3.50%	11.00%	yes	2.80%	5.70%	yes
Beckman DxC 800	B21	A20	0.9755	7.80%	10.40%	yes	-3.70%	5.70%	yes
Beckman DxC 800	B21	B20	0.9857	10.00%	9.00%	no	-1.10%	4.10%	yes
Beckman DxC 800	B21	B22	0.9716	10.90%	10.30%	no	-5.20%	5.20%	no

Beckman DxC 800	B21	C20	0.9877	3.70%	8.00%	yes	-5.10%	6.20%	yes
Beckman DxC 800	B21	C21	0.9719	11.30%	11.90%	yes	-2.70%	6.30%	yes
Beckman DxC 800	B21	C22	0.9823	1.60%	10.90%	yes	1.30%	10.40%	yes
Beckman AU 680	B7	A7	0.9793	2.60%	8.60%	yes	1.90%	5.70%	yes
Beckman AU 680	C20	A20	0.9721	5.30%	10.50%	yes	3.30%	5.90%	yes
Beckman AU 680	C20	B20	0.9922	6.30%	7.30%	yes	4.30%	3.30%	no
Beckman AU 680	C20	B21	0.9877	-3.30%	7.10%	yes	5.10%	6.10%	yes
Beckman AU 680	C20	B22	0.9738	6.80%	9.50%	yes	-0.60%	5.00%	yes
Beckman AU 680	C20	C21	0.9704	7.20%	11.10%	yes	3.60%	6.20%	yes
Beckman AU 680	C20	C22	0.9803	-2.40%	11.20%	yes	5.10%	10.50%	yes
Ortho-CD Vitros 5,1 FS	B1	A1	0.9733	-5.10%	9.30%	yes	3.40%	5.20%	yes
Ortho-CD Vitros 5,1 FS	B15	A15	0.995	-1.70%	4.80%	yes	1.10%	3.00%	yes
Ortho-CD Vitros 5600	B19	A19	0.9709	-4.90%	13.40%	yes	-3.90%	7.90%	yes
Abbott c8000	B2	A2	0.9976	-0.70%	5.10%	yes	0.40%	2.50%	yes
ABBOTT c16000	B3	A3	0.983	-3.50%	6.80%	yes	3.80%	4.40%	yes
Abbott c8000	B4	A4	0.9917	-8.20%	5.40%	no	-4.10%	5.00%	yes
Abbott c8000	A14	B14	0.9799	-1.60%	8.30%	yes	0.30%	4.70%	yes
Abbott c8000	A15	B15	0.995	1.60%	4.70%	yes	-1.10%	5.00%	yes
Abbott c8000	B20	A20	0.9862	-3.60%	7.60%	yes	-4.20%	4.40%	yes
Abbott c8000	B20	B21	0.9857	-8.00%	7.20%	no	1.10%	6.00%	yes
Abbott c8000	B20	B22	0.9866	-0.30%	6.70%	yes	-5.00%	3.50%	no
Abbott c8000	B20	C20	0.9922	-5.60%	6.50%	yes	-4.00%	5.50%	yes
Abbott c8000	B20	C21	0.9834	-1.60%	8.30%	yes	-2.20%	4.90%	yes
Abbott c8000	B20	C22	0.9875	-7.20%	9.10%	yes	1.50%	9.50%	yes
Konelab	C21	A20	0.9941	-5.20%	5.60%	yes	-1.40%	3.20%	yes
Konelab	C21	B20	0.9834	1.70%	9.00%	yes	2.40%	4.30%	yes
Konelab	C21	B21	0.9719	-9.30%	9.60%	yes	2.70%	7.20%	yes
Konelab	C21	B22	0.9923	-0.40%	5.40%	yes	-1.80%	2.80%	yes
Konelab	C21	C20	0.9704	-6.70%	10.30%	yes	-3.50%	7.20%	yes
Konelab	C21	C22	0.9883	-8.30%	9.40%	yes	3.70%	9.60%	yes

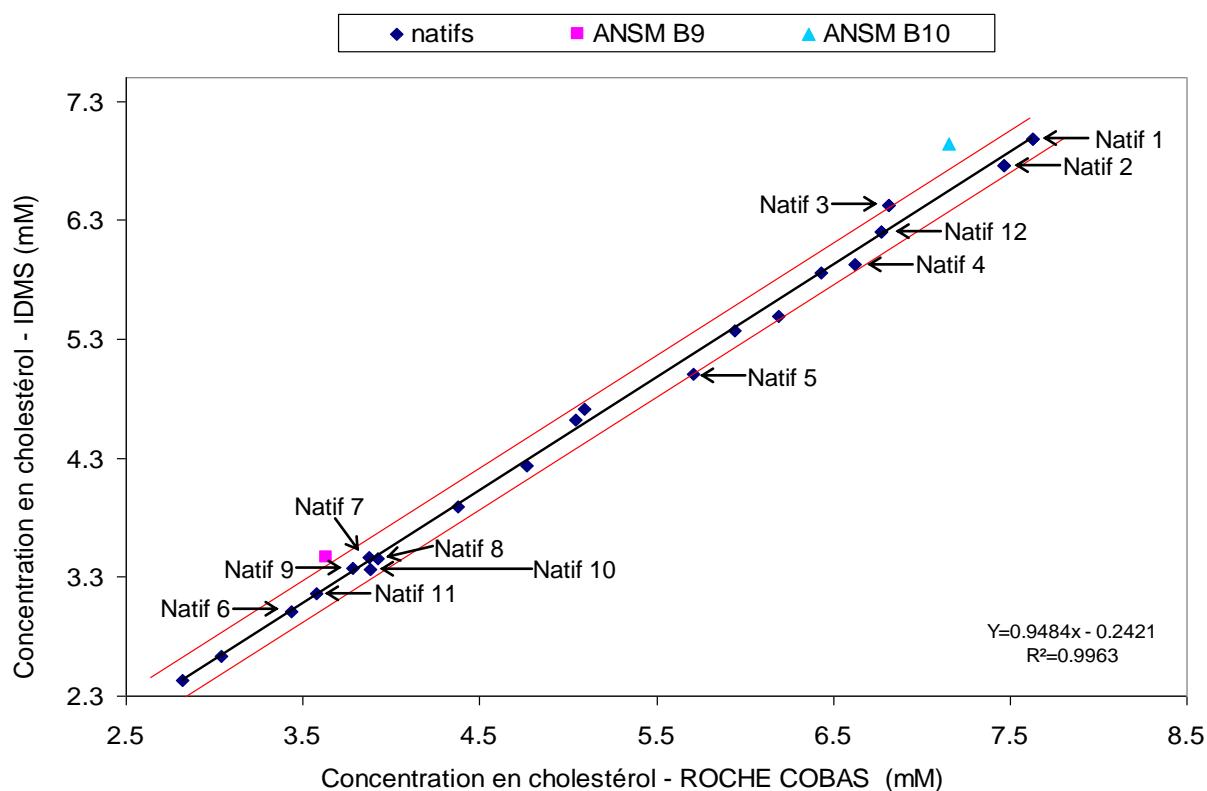


## IV. La correction de non commutabilité : une alternative aux échantillons non commutables

Lorsque les échantillons de contrôle de la qualité ne sont pas commutables, une alternative permet de les utiliser afin d'évaluer la justesse des méthodes de routine. Son principe consiste à déterminer quantitativement les effets de matrice en vue de les soustraire pour avoir accès au « biais méthode ». La commutabilité étant méthode et échantillon dépendante, le biais matriciel mesuré est spécifique à un échantillon pour une méthode donnée. La seule méthode de correction actuellement décrite dans la littérature est celle développée par Ross *et al.* [38]. En effet, même si la régression linéaire est utilisée pour évaluer la commutabilité, cette approche n'a pas encore été mise à profit pour la détermination quantitative des effets de matrice [168]. Dans ce chapitre, la méthode de Ross a été comparée à de nouvelles approches développées au laboratoire utilisant la régression linéaire et une correction par plage de concentrations.

### 1. Matériels et Méthodes

Les données utilisées à titre d'exemple pour effectuer la correction de non commutabilité ont été obtenues pour le dosage du cholestérol total par un laboratoire utilisant une méthode de spectrophotométrie avec un chromogène phénolique sur un automate Roche Cobas C501 (réactif « Integra/Cobas[c]series|CHOL2 ») (Figure 47).



**Figure 47 : Evaluation de la commutabilité des échantillons de sérum lyophilisés B9 et B10 pour la méthode utilisée sur un automate Roche Cobas.**



Les effets de matrice ont été corrigés sur les échantillons de sérum lyophilisés B9 et B10 du contrôle national de la qualité organisé par l'ANSM dont les concentrations déterminées par GC-ID/MS sont respectivement de  $3,47 \pm 0,075$  mmol/L ( $k=2$ ) et  $6,94 \pm 0,13$  mmol/L ( $k=2$ ). L'étude de commutabilité, organisée par le laboratoire et abordée précédemment dans le Chapitre III, a permis de démontrer la non commutabilité de ces échantillons pour la plupart des méthodes de routine. Pour cela, B9 et B10 ainsi que 21 sérums natifs ont été analysés à la fois en triplicat par ID-GC/MS et par la méthode Roche Cobas. La régression linéaire obtenue à partir des échantillons natifs est représentée sur la Figure 47. Ces échantillons sont par définition commutables car ils correspondent à des échantillons frais uniques de patients prélevés le jour même et n'ayant subi ni congélation ni ajout de substances exogènes (exemple : conservateurs).

### 1.1. Correction de non commutabilité en un point

Cette approche est la plus rapportée dans la littérature. Elle permet de déterminer un facteur correctif des effets de matrice grâce à l'utilisation de l'équation développée par Ross *et al* en 1993 [38]. Pour ce faire, il est nécessaire de disposer d'un échantillon commutable dont la concentration est voisine de celle de l'échantillon à corriger. Cette équation est la suivante :

$$F_{correctif} = \left(1 + \frac{X_C - C_C}{C_C}\right) \times \frac{C_{NC}}{X_{NC}} \quad \text{Équation (3)}$$

Avec :

- $X_C$  : concentration en cholestérol total obtenue par le laboratoire de routine sur un échantillon commutable.
- $X_{NC}$  : concentration en cholestérol total obtenue par le laboratoire de routine sur un échantillon non commutable.
- $C_C$  : concentration en cholestérol total obtenue avec la méthode de référence primaire par ID-GC/MS sur un échantillon commutable.
- $C_{NC}$  : concentration en cholestérol total obtenue avec la méthode de référence primaire par ID-GC/MS sur un échantillon non commutable.

Il est ensuite appliqué à la valeur mesurée par le laboratoire de routine pour calculer la valeur corrigée. Cette valeur est ensuite comparée à la valeur de référence afin de déterminer le biais méthode selon l'équation ci-après.

$$Biais_{méthode}(\%) = \frac{V_{corrigée} - V_{référence}}{V_{référence}} \times 100 \quad \text{Équation (4)}$$

La correction de non commutabilité a été effectuée en utilisant un sérum natif dont la concentration est proche de celle de l'échantillon lyophilisé. Au total, 11 sérums natifs différents ont été utilisés afin de calculer le biais méthode, 6 échantillons pour B9 et 6 échantillons pour B10. Ces résultats ont permis de déduire les biais matriciels entraînés par ces échantillons grâce aux équations suivantes :

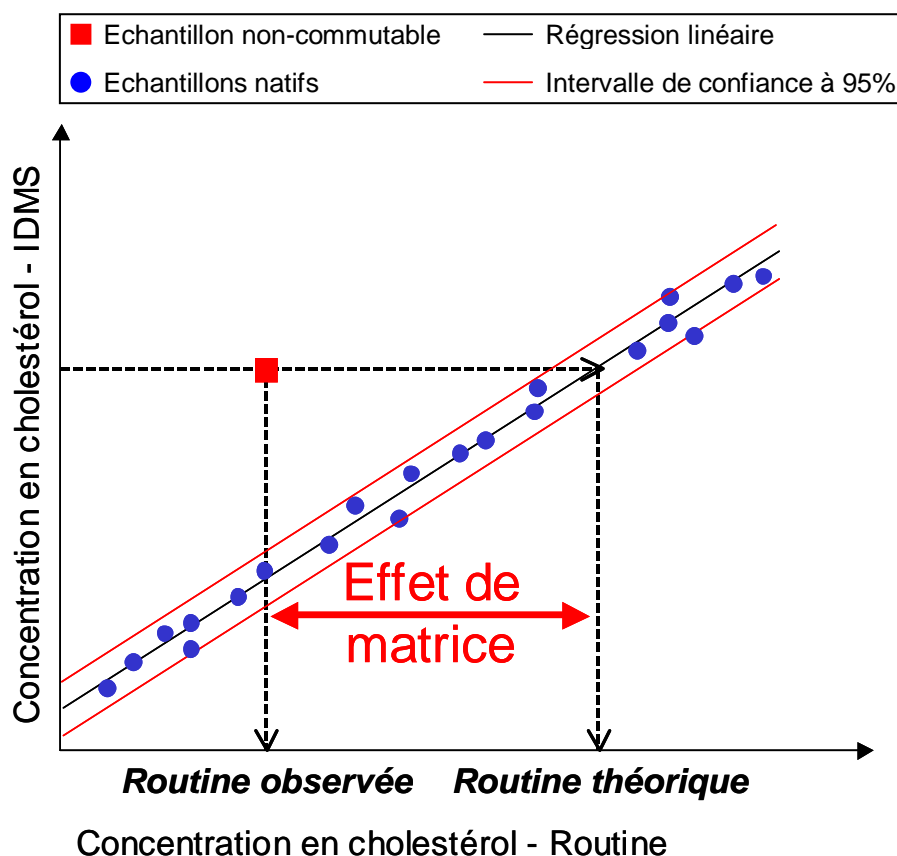
$$Biais_{total}(\%) = Biais_{méthode}(\%) + Biais_{matriciel}(\%) \quad \text{Équation (5)}$$

$$Biais_{matriciel}(\%) = Biais_{total}(\%) - Biais_{méthode}(\%) \quad \text{Équation (6)}$$

## 1.2. Correction de non commutabilité par régression linéaire

Cette méthode repose sur une régression linéaire, obtenue à partir d'au minimum vingt sérums natifs, qui traduit le comportement typique d'échantillons commutables [168]. Les échantillons ont été sélectionnés de manière à couvrir une large gamme de concentration, allant de concentrations physiologiques à pathologiques. Le principe de cette correction est schématisé en Figure 48.

Dans ce chapitre, le cholestérol total présent dans les sérums natifs et dans les échantillons de sérum lyophilisés a été quantifié par ID-GC/MS et par la méthode Roche Cobas. L'analyse des résultats par « *generalized least squares* » (GLS) permet de générer la régression linéaire représentée en Figure 47 en tenant compte des incertitudes de chaque point.



**Figure 48 : Détermination de l'effet de matrice par l'utilisation d'une régression linéaire déterminée à l'aide de 21 échantillons natifs de sérum humain.**

L'effet de matrice de l'échantillon est déterminé en calculant la différence entre la valeur observée et la valeur théorique modélisée à partir de la droite. L'équation utilisée est la suivante :

$$EffetMatrice(\%) = \frac{V_{observée} - V_{théorique}}{V_{théorique}} \times 100 \quad \text{Équation (7)}$$

Le facteur correctif est déterminé à partir de l'effet de matrice de la façon suivante :

$$Facteur\_correctif = \frac{100 - effet\_matrice(\%)}{100} \quad \text{Équation (8)}$$

Il est appliqué à la valeur mesurée par le laboratoire de routine pour calculer la valeur corrigée. Le biais méthode est calculé selon l'Equation 4.

### 1.3. Correction de non commutabilité par plage de concentrations

Cette approche consiste à corriger les effets de matrice grâce à l'utilisation de plusieurs sérums natifs dont les concentrations sont proches de celles de l'échantillon non commutable.

Jusqu'à 6 sérums natifs ont été utilisés pour calculer les effets de matrice associés aux échantillons B9 et B10. Le biais méthode moyen, déterminé pour une plage de concentration donnée et pour un nombre d'échantillon natif donné, a été calculé en moyennant les biais méthode de chaque natif pris en compte.

## 2. Résultats et Discussion

### 2.1. Correction de non commutabilité en un point

Les résultats de correction de non commutabilité calculée sur les échantillons lyophilisés B9 et B10 sont rapportés dans le Tableau 20. Le facteur correctif utilisé a été déterminé selon l'équation de Ross (Équation 3). Le biais matriciel a été calculé selon l'Equation 6.

<i>Données brutes</i>			<i>Calcul du biais méthode</i>			
Echantillons	V IDMS (mmol/L)	V laboratoire (mmol/L)	Facteur correctif	V corrigée (mmol/L)	Biais méthode (%)	Biais matriciel (%)
<b>ANSM B9</b>	<b>3.47</b>	<b>3.63</b>	<b>correction échantillon B9</b>			
natif 7	3.47	3.87	1.07	3.88	11.68 %	-7.07 %
natif 8	3.46	3.92	1.08	3.93	13.38 %	-8.77 %
natif 9	3.38	3.78	1.07	3.89	12.01 %	-7.40 %
natif 10	3.37	3.88	1.10	4.00	15.27 %	-10.66 %
natif 11	3.16	3.58	1.08	3.92	13.08 %	-8.47 %
natif 1	6.98	7.63	1.04	3.79	9.31 %	-4.70 %
<b>ANSM B10</b>	<b>6.94</b>	<b>7.16</b>	<b>correction échantillon B10</b>			
natif 1	6.98	7.63	1.06	7.59	9.31 %	-6.19 %
natif 2	6.76	7.46	1.07	7.66	10.36 %	-7.23 %
natif 3	6.42	6.82	1.03	7.37	6.23 %	-3.11 %
natif 4	5.93	6.62	1.08	7.75	11.61 %	-8.49 %
natif 5	5.01	5.71	1.10	7.90	13.89 %	-10.76 %
natif 6	3.01	3.44	1.11	7.93	14.25 %	-11.12 %

**Tableau 20 : Correction de non commutabilité à l'aide d'un échantillon natif de sérum humain : comparaison des biais méthode observés suivant les échantillons natifs utilisés.**  
(V IDMS : valeurs obtenues avec la méthode de référence, V laboratoire : valeurs obtenues par le laboratoire travaillant sur un automate Roche Cobas).

Le biais total mesuré sans correction contre les valeurs ID-GC/MS étaient de +4,61 % pour l'échantillon B9 et +3,12 % pour l'échantillon B10. Les effets de matrice ont été corrigés avec les sérums natifs dont la concentration était la plus proche de celle des sérums lyophilisés, soit le natif 7 pour l'échantillon B9 et le natif 1 pour B10. Le biais méthode calculé était respectivement de +11,68 % et +9,31 % avec les échantillons B9 et B10. Les effets de matrice observés pour cette méthode sont donc de -7,07 % pour l'échantillon B9 et de -6,19 % pour l'échantillon B10.

Les biais méthode ont également été déterminés avec 5 autres sérums natifs dont les concentrations étaient de plus en plus éloignées de celles des échantillons lyophilisés. Le biais méthode moyen de l'échantillon B9 calculé à partir des 6 natifs était de +12,46 %. Suivant l'échantillon natif utilisé pour corriger les effets de matrice, les biais méthode variaient de +9,31 à +15,27 %. Concernant l'échantillon B10, le biais réel moyen calculé à partir des natifs 1 à 6 était de +10,94 % et les valeurs individuelles variaient de +6,23 à +14,25 %. Ces résultats traduisent une importante variation du biais méthode, suivant l'échantillon natif utilisé.

Pour l'échantillon B9, la correction de non commutabilité réalisée avec le natif 10 a permis de déterminer un biais méthode de +15,27 %. Ce biais était plus important de 3,59 % par rapport à celui calculé avec le natif 7, bien que la différence de concentration entre ces deux échantillons soit de seulement 0,1 mmol/L. A titre d'exemple, le biais obtenu avec le natif 10 (3,37 mmol/L) était supérieur de 3,26 % à celui obtenu avec le natif 9 (3,38 mmol/L) mais était également plus faible de 2,19 % que celui obtenu avec le natif 11 (3,16 mmol/L). Il est donc difficile de prédire quel échantillon natif permettra de déterminer le biais de la méthode le plus représentatif de la réalité en se basant uniquement sur sa concentration.

Concernant l'échantillon B10, lorsque la correction a été réalisée avec le natif 6 (3,01 mmol/L), le biais méthode mesuré était plus important de 4,93 % par rapport à celui déterminé avec le natif dont la concentration était la plus proche du sérum lyophilisé. Le natif 3 semblait quant à lui être un échantillon particulier induisant potentiellement des interférences avec la méthode utilisée, et pour lequel le biais méthode était plus faible de 3,08 % par rapport à celui calculé avec le natif 1. Si la correction de non commutabilité est faite à l'aide de cet échantillon particulier, le biais mesuré ne sera pas représentatif du comportement moyen observé et l'interprétation sera erronée.

Ces résultats mettent en évidence la grande variabilité des biais méthode observée suivant le natif choisi et par conséquent la faible robustesse de cette approche se basant sur un unique sérum natif.

## **2.2. Correction de non commutabilité par régression linéaire**

Différentes régressions linéaires, utilisant un nombre variable de natifs sélectionnés de manière aléatoire, ont été générées. L'impact du nombre de natifs sur le calcul du biais méthode a été

évalué. Les effets de matrice ainsi que les biais méthode calculés sont reportés dans le Tableau 21.

échantillon B9					échantillon B10			
nombre de natifs	effet de matrice (%)	V corrigée (mmol/L)	U (k=2) (mmol/L)	Biais méthode (%)	effet de matrice (%)	V corrigée (mmol/L)	U (k=2) (mmol/L)	Biais méthode (%)
21	-7.30%	3.89	0.11	12.25%	-5.50%	7.55	0.15	8.79%
15	-7.40%	3.90	0.11	12.35%	-5.70%	7.56	0.16	9.00%
15	-7.20%	3.89	0.11	12.14%	-6.60%	7.63	0.15	9.93%
15	-6.80%	3.88	0.11	11.72%	-5.60%	7.56	0.15	8.90%
10	-6.70%	3.87	0.10	11.62%	-4.60%	7.49	0.20	7.87%
10	-7.10%	3.89	0.11	12.04%	-5.20%	7.53	0.18	8.48%
10	-6.80%	3.88	0.11	11.72%	-5.10%	7.52	0.17	8.38%
5	-8.00%	3.92	0.12	12.98%	-7.40%	7.69	0.25	10.75%
5	-7.30%	3.89	0.11	12.25%	-5.50%	7.55	0.15	8.79%
5	-6.80%	3.88	0.11	11.72%	-4.30%	7.46	0.22	7.56%

**Tableau 21 : Comparaison de résultats de correction de non commutabilité par régression linéaire déterminée à partir d'un nombre variable de sérums natifs.**

*Les incertitudes élargies ont été déterminées par GLS et correspondent à l'incertitude du modèle.*

*Le biais méthode est égal à la différence entre la valeur corrigée et la valeur obtenue par la méthode de référence soit 3.47 mmol/L pour B9 et 6.94 mmol/L pour B10*

Les biais méthode calculés à partir de la régression linéaire prenant en compte la totalité des 21 natifs étaient de +12,25 % sur l'échantillon B9 et de +8,79 % sur l'échantillon B10.

Concernant l'échantillon B9, les biais moyens mesurés étaient de 12,07 % avec 15 échantillons, 11,79 % avec 10 échantillons et 12,32 % avec 5 échantillons. Lorsque l'échantillon utilisé était B10, les biais moyens étaient de 9,27 % avec 15 échantillons, 8,24 % avec 10 échantillons et 9,03 % avec 5 échantillons. Au vu des incertitudes élargies déterminées par « *generalized least squares* » (GLS), les résultats obtenus avec un nombre variable de natifs n'étaient pas significativement différents.

L'analyse des biais méthode calculés pour les échantillons B9 et B10 à partir de différentes combinaisons aléatoires de sérums natifs a montré que plus le nombre d'échantillons pris en compte était faible et plus le choix de l'échantillon avait un impact sur le biais méthode calculé. Pour l'échantillon B9, la différence observée entre les biais minimum et maximum était de 1,26 % avec 5 sérums natifs et de 0,42 % avec 10 sérums natifs. Pour l'échantillon B10, une différence maximale de 3,19 % a été observée lorsque les biais méthode étaient calculés avec deux combinaisons différentes de 5 sérums natifs. Lorsque 10 échantillons natifs étaient pris en compte, la différence maximale n'était plus que de 0,61 %.

Afin d'évaluer rigoureusement la justesse des méthodes de routine il faudrait que la différence de biais matriciel calculé à partir de deux échantillons natifs soit faible, voire négligeable, comparé aux critères de biais de 3 % du NCEP pour le dosage du cholestérol total. Or, dans cet exemple, il est apparu qu'en fonction des échantillons les différences observées pouvaient être supérieures à ce seuil. Ces résultats ont permis de démontrer que le choix des sérums natifs utilisés pour corriger les biais matriciels avait des effets significatifs sur le calcul du biais méthode. De plus, les biais méthode étant très largement supérieurs aux critères NCEP, la variabilité due à la sélection des échantillons n'aura pas d'impact sur l'interprétation des données de justesse. Néanmoins, pour une méthode dont la justesse est proche de la valeur seuil, la conclusion pourrait être différente selon les échantillons natifs choisis.

Pour l'exemple choisi, ces différents résultats ont démontré que le nombre de points utilisés afin de déterminer la régression linéaire avait un impact relativement faible (pour un nombre minimum testé de 5 points). Il a également été montré que la variabilité entre les différents biais était principalement due au choix des natifs sélectionnés. Le coefficient de corrélation de la droite obtenue avec 21 sérums natifs était très élevé ( $R^2=0,9963$ ) et traduisait une très bonne corrélation entre les résultats (Figure 47). Dans ce cas, il est possible de réduire à 15 le nombre de sérums natifs utilisés pour la régression linéaire. Néanmoins, pour certaines méthodes de routine une dispersion plus importante des résultats pourrait être observée. C'est le cas par exemple du dosage du LDL-cholestérol et du HDL-cholestérol où les coefficients de corrélation sont plus faibles (cf. Chapitre 3). Il sera alors nécessaire d'utiliser un nombre suffisamment important de sérums natifs (supérieur à 20) afin de moyenniser l'impact lié au choix des échantillons et obtenir une régression linéaire la plus représentative possible.

Cette approche a pour principal avantage de permettre, à partir de la même régression linéaire, une correction simultanée des effets de matrice de plusieurs échantillons de concentrations différentes. Cependant, pour une méthode donnée les biais mesurés pourraient ne pas être proportionnels sur toute la gamme de concentration étudiée. Dans ce cas, le coefficient de corrélation serait très faible et la régression linéaire moyennerait les effets dus à la concentration sur le calcul du biais méthode.

### **2.3. Correction de non commutabilité par plage de concentration**

Les valeurs individuelles des échantillons natifs utilisés pour corriger le biais matriciel sont reportées dans le Tableau 1. L'effet du choix et du nombre de natifs sur la valeur de biais méthode moyen a été évalué en générant aléatoirement différentes combinaisons. Les résultats obtenus sont reportés dans le Tableau 22.

échantillon B9			échantillon B10		
	Echantillons utilisés	Biais méthode moyen (%)		Echantillons utilisés	Biais méthode moyen (%)
2 natifs	natifs 7 et 8	12.53 %		natifs 1 et 2	9.83 %
	natifs 7 et 9	11.85 %		natifs 1 et 3	7.77 %
	natifs 7 et 10	13.47 %		natifs 1 et 4	10.46 %
	natifs 7 et 11	12.38 %		natifs 1 et 5	11.60 %
	natifs 8 et 9	12.70 %		natifs 2 et 4	10.98 %
	<b>Moyenne</b>	<b>12.59 %</b>		<b>Moyenne</b>	<b>10.13 %</b>
	<b>CV<sub>relatif</sub></b>	<b>4.69 %</b>		<b>CV<sub>relatif</sub></b>	<b>14.52 %</b>
	<b>V<sub>max</sub>-V<sub>min</sub></b>	<b>1.62 %</b>		<b>V<sub>max</sub>-V<sub>min</sub></b>	<b>3.83 %</b>
3 natifs	natifs 7, 8 et 9	12.36 %		natifs 1,2 et 3	8.63 %
	natifs 7,8 et 10	13.44 %		natifs 1,2 et 4	10.43 %
	natifs 7,9 et 10	12.99 %		natifs 1,3 et 4	9.05 %
	natifs 7,8 et 11	12.71 %		natifs 1,2 et 5	11.18 %
	natifs 7,9 et 11	12.26 %		natifs 1,3 et 5	9.81 %
	<b>Moyenne</b>	<b>12.75 %</b>		<b>Moyenne</b>	<b>9.82 %</b>
	<b>CV<sub>relatif</sub></b>	<b>3.79 %</b>		<b>CV<sub>relatif</sub></b>	<b>10.47 %</b>
	<b>V<sub>max</sub>-V<sub>min</sub></b>	<b>1.18 %</b>		<b>V<sub>max</sub>-V<sub>min</sub></b>	<b>2.55 %</b>
4 natifs	natifs 7,8,9 et 10	13.09 %		natifs 1,2,3 et 4	9.38 %
	natifs 7,8,9 et 11	12.54 %		natifs 1,2,3 et 5	9.95 %
	natifs 6,7,10 et 11	13.57 %		natifs 1,2,4 et 5	11.29 %
	natifs 6,8,9 et 11	13.18 %		natifs 1,3,4 et 5	10.26 %
	natifs 6,7,8 et 10	13.64 %		natifs 2,3,4 et 5	10.52 %
	<b>Moyenne</b>	<b>13.20 %</b>		<b>Moyenne</b>	<b>10.28 %</b>
	<b>CV<sub>relatif</sub></b>	<b>3.35 %</b>		<b>CV<sub>relatif</sub></b>	<b>6.89 %</b>
	<b>V<sub>max</sub>-V<sub>min</sub></b>	<b>1.10 %</b>		<b>V<sub>max</sub>-V<sub>min</sub></b>	<b>1.91 %</b>
5 natifs	natifs 7,8,9,10 et 11	13.08 %		natifs 1,2,3,4 et 5	10.28 %
	natifs 6,7,8,9 et 10	13.32 %		natifs 1,2,3,4 et 12	9.32 %
	natifs 6,8,9, 10 et 11	13.60 %		natifs 2,3,4,5 et 12	10.24 %
	natifs 6,7,9,10 et 11	13.26 %		natifs 1,2,4,5 et 12	10.85 %
	natifs 6,7,8,9 et 11	12.88 %		natifs 1,2,3,5 et 12	9.78 %
	<b>Moyenne</b>	<b>13.23 %</b>		<b>Moyenne</b>	<b>10.09 %</b>
	<b>CV<sub>relatif</sub></b>	<b>2.03 %</b>		<b>CV<sub>relatif</sub></b>	<b>5.71 %</b>
	<b>V<sub>max</sub>-V<sub>min</sub></b>	<b>0.72 %</b>		<b>V<sub>max</sub>-V<sub>min</sub></b>	<b>1.53 %</b>

**Tableau 22: Approche par plage de concentration : Effet du choix et du nombre de sérums natifs sur le biais méthode du Roche Cobas.**

Qu'il s'agisse de l'échantillon B9 ou B10, le CV observé était d'autant plus important que le nombre de natifs pris en compte était faible. Il s'explique par une importante différence entre les biais méthode moyens calculés à partir de différents sérums natifs.

Pour l'échantillon B9, la différence observée entre les biais minimum et maximum était inférieure aux critères de biais de 3 % fixés par le NCEP quelque soit le nombre de sérums natifs pris en compte. Cette différence était d'autant plus faible que le nombre d'échantillons pris en considération était important. Lorsque deux sérums natifs étaient utilisés la différence observée était de 1,62 % et diminuait jusqu'à 1,10 % et 0,72 % avec quatre et cinq sérums natifs



respectivement. Ces résultats ont permis de conclure qu'il était suffisant d'utiliser 4 sérums natifs, le biais matriciel étant trois fois plus faible que le biais maximal toléré.

Concernant l'échantillon B10, la différence maximale calculée entre les biais méthode moyens était plus importante lorsque peu de sérums natifs étaient pris en compte. Avec deux sérums natifs une différence de 3,83 % était observée. Cette valeur étant largement supérieure aux critères NCEP il n'est donc pas raisonnable d'utiliser un nombre aussi faible d'échantillons. L'utilisation de cinq sérums natifs a permis de réduire la différence entre les biais minimum et maximum observés à 1,53 %. Cependant, les effets de matrice engendrés correspondaient à plus de la moitié du biais recommandé par le NCEP. Lorsqu'un coefficient de variation important est observé, notamment liée à la présence d'échantillons particuliers, il est cependant préférable d'utiliser un nombre plus important de sérums natifs. Cela aura pour conséquence de réduire leur impact sur la détermination du biais méthode moyen.

L'avantage de cette approche est qu'elle permettrait une meilleure estimation du biais méthode lorsqu'un effet de la concentration non proportionnel est observé par l'approche de régression linéaire. En effet, la correction de l'effet de matrice est réalisée sur une gamme de concentration restreinte. De plus, contrairement à l'approche utilisant une régression linéaire où 20 échantillons sont nécessaires, le biais méthode peut être déterminé à partir d'un nombre plus faible de sérum natifs de concentrations proches. Cependant, il sera nécessaire d'utiliser autant de plage de concentration que d'échantillons de sérum non commutables de concentrations différentes.

### **3. Conclusion**

En conclusion, les résultats obtenus dans ce chapitre ont permis de proposer une alternative intéressante afin d'utiliser des échantillons non commutables pour évaluer la justesse des méthodes de routine. Bien que les résultats décrits reposent sur peu de données, l'approche de correction de non commutabilité utilisant un échantillon unique de sérum natif n'est pas adaptée. La limitation de cette méthode repose sur son manque de robustesse lié à la différence de comportement pouvant être rencontrée suivant le sérum natif utilisé pour effectuer la correction de non commutabilité.

Afin de s'affranchir de cette limitation, deux approches peuvent être utilisées. La première repose sur une régression qui permet de déduire le comportement type d'un échantillon commutable. Dans ce cas, il est nécessaire de disposer d'un seul modèle sur l'ensemble du domaine. En effet, il est recommandé de ne pas utiliser cette approche lorsque le biais de la méthode de routine n'est pas proportionnel sur toute la gamme de concentration donnée. Dans ce cas il est conseillé d'utiliser l'approche par « plage de concentration » qui permet également d'utiliser un nombre plus faible de sérums natifs. Il faut cependant rester prudent et utiliser un nombre suffisant de sérums natifs en fonction de la dispersion de la méthode évaluée et l'analyte dosé.

## **V. Développement d'une nouvelle méthode de référence du LDL-cholestérol**

Les résultats exposés dans le Chapitre III ont confirmé que les méthodes utilisées par les laboratoires de biologie médicale pour mesurer LDL-cholestérol étaient susceptibles d'être interférées. Il est donc important de disposer d'une méthode de référence spécifique capable d'identifier précisément ce que mesurent ces méthodes.

A l'heure actuelle il n'existe qu'une seule méthode de référence répertoriée par le JCTLM pour le dosage du LDL-cholestérol : la  $\beta$ -quantification [150]. Cependant cette méthode possède deux limitations majeures. D'une part, la détermination du LDL-cholestérol est indirecte car elle repose sur 2 mesures de cholestérol indépendantes. D'autre part, cette méthode manque de spécificité car elle ne mesure pas uniquement le cholestérol associé aux LDL mais aussi celui associé aux IDL et à la Lp(a). Les lipoprotéines se différenciant par leur composition en apolipoprotéines, une alternative permettant de purifier les LDL serait d'utiliser des anticorps dirigés contre les apolipoprotéines présentes au sein des lipoprotéines autres que les LDL pour les éliminer. Une approche utilisant des billes de latex fonctionnalisées avec des anticorps anti-apoA-I et anti-apoE a initialement été mise au point par la société Genzyme [131, 132]. Afin de développer une méthode de dosage directe et spécifique, différentes méthodes d'immuno-séparation ont été testées sur des échantillons normolipidémiques et sont décrites dans ce chapitre. Ces approches étaient basées notamment sur la méthode de Genzyme et également sur la méthode utilisant une colonne d'affinité développée par Gautier *et collaborateurs* [169].

### **1. Matériels et Méthodes**

#### **Purification de lipoprotéines à l'aide de microbilles fonctionnalisées**

Dans cette approche, des microbilles magnétiques fonctionnalisées avec des anticorps et commercialisées par la société Merck Millipore (Allemagne) ont été mises en œuvre. Les anticorps polyclonaux anti-apoA-I, anti-apoA-II, anti-apoE (Rockland, USA) et anti-Lp(a) (Fitzgerald, USA) ont été produits chez la chèvre et étaient dirigés contre les apolipoprotéines humaines. Chaque solution contenait 1% de billes fonctionnalisées dans un tampon de phosphate/glycine à pH 7,4. La concentration en anticorps était de 15 mg par gramme de billes.

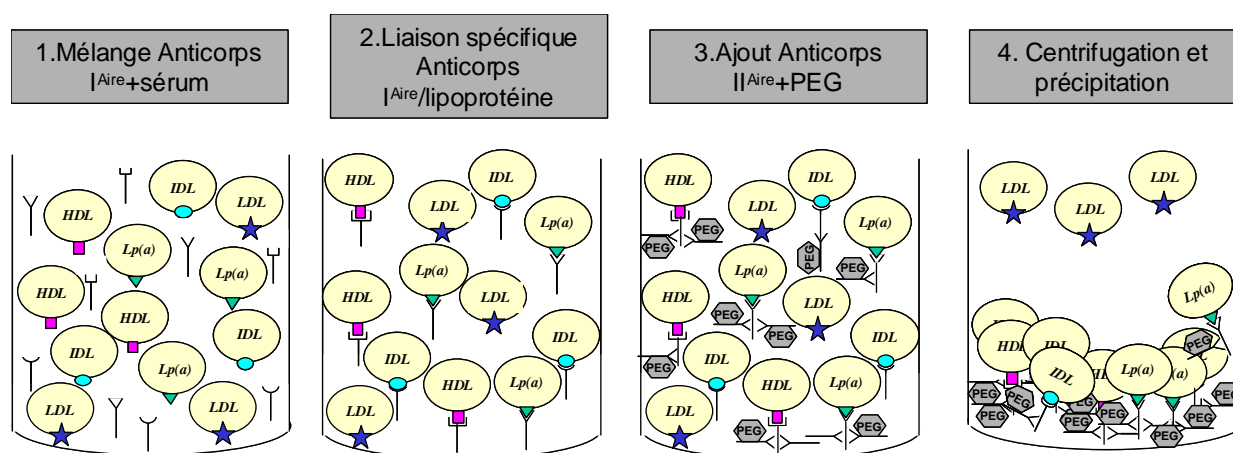
Les billes et le sérum ont été incubés 2 heures à température ambiante sous agitation, puis le surnageant a été isolé après avoir placé les tubes réactionnels sur un aimant.

Le rendement de purification a été mesuré qualitativement. 100  $\mu$ L d'échantillon ont été injectés en FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography, Akta Purifier GE, France) et élués par un gradient isocratique de tampon TSE (NaCl 150 mmol/L, Tris 50 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, NaN<sub>3</sub> 0,02 %, pH

7,4) à un débit de 0,3 mL/min. Des fractions de 200 µL ont été collectées. Les fractions 17 à 31 contenaient les LDL et les fractions 32 à 47 les HDL. Le cholestérol présent dans chaque fraction a été dosé par méthode enzymatique (Cholesterol FS, Diasys France) ou par la méthode de référence ID-GC/MS validée au laboratoire.

## 1.2. Purification de lipoprotéines via la formation de complexes d'anticorps primaires, secondaires et de PEG

Cette approche a consisté à former des complexes composés de lipoprotéines, d'anticorps primaires, d'anticorps secondaires et de polyéthylène glycol (PEG) pouvant ensuite être éliminés par une étape de centrifugation (Figure 49).



**Figure 49 : Principe de la précipitation des complexes composés de lipoprotéines, d'anticorps et de polyéthylène glycol (PEG).**

Les anticorps primaires utilisés étaient des anticorps polyclonaux anti-apoA-I produits chez la chèvre et dirigés contre les protéines humaines (Acris antibodies, Allemagne). Ils ont été conservés dans un tampon à pH 8,0 ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  0,125 mol/L, NaCl 75 mmol/L, EDTA 5 mmol/L) à une concentration de 1g/L. Les anticorps secondaires polyclonaux anti-chèvre étaient produits chez l'âne (Jackson ImmunoResearch laboratories, USA) et avaient une concentration de 1,3 g/L. Ils ont été conservés dans un tampon à pH 7,6 contenant 0,01 mmol/L de phosphate de sodium et 0,25 mmol/L de NaCl. Les tampons PEG 6000 étaient composés de 9 g/L de NaCl, 40 mmol/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 20 mmol/L de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  et 40, 80 ou 160 g/L de PEG 6000 (ce qui correspond respectivement à 4, 8 et 16 %).

Après l'ajout des anticorps primaires au sérum, le mélange a été incubé une heure à 37°C. Les anticorps secondaires ont ensuite été ajoutés et le mélange à nouveau incubé une heure à 37°C.

La solution de PEG 8 % a été ajoutée puis le mélange a été centrifugé 15 minutes à 14 500 g après une incubation de 15 minutes à 37 °C. Le surnageant a ensuite été injecté en FPLC et le cholestérol a été dosé dans les différentes fractions collectées à l'aide des kits enzymatiques utilisés précédemment.

Les échantillons ont également été analysés par Western Blot afin de vérifier si l'élimination des HDL était totale. Les anticorps primaires utilisés étaient des anticorps polyclonaux anti-apoA-I humaine exprimés chez le lapin (Calbiochem, France). Les anticorps secondaires couplés à une peroxydase étaient produits chez la chèvre et étaient dirigés contre les anticorps de lapin (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA).

### 1.3. Purification de lipoprotéines par colonnes d'affinité

La première approche par colonne d'affinité utilisée une colonne « HiTrap Protein A HP » (GE Healthcare, Suède). Le principe de cette approche, basé sur la très forte affinité entre la protéine A et les anticorps, est représenté sur la Figure 50.

Les anticorps primaires utilisés étaient des anticorps polyclonaux anti-apoA-I utilisés lors des essais de précipitation avec le PEG. Dans un premier temps les anticorps ont été ajoutés au sérum. Le mélange a ensuite été dilué d'un facteur 1/2 par le tampon de fixation (0,02 mmol/L de phosphate de sodium à pH 7,0) et incubé une heure à 37°C avant d'être injecté sur la colonne avec le tampon de fixation à un débit de 1 mL/min. Le tampon d'élution utilisé pour éliminer les complexes fixés sur la colonne était composé de 0,1 mol/L de citrate de sodium à pH 4,0.

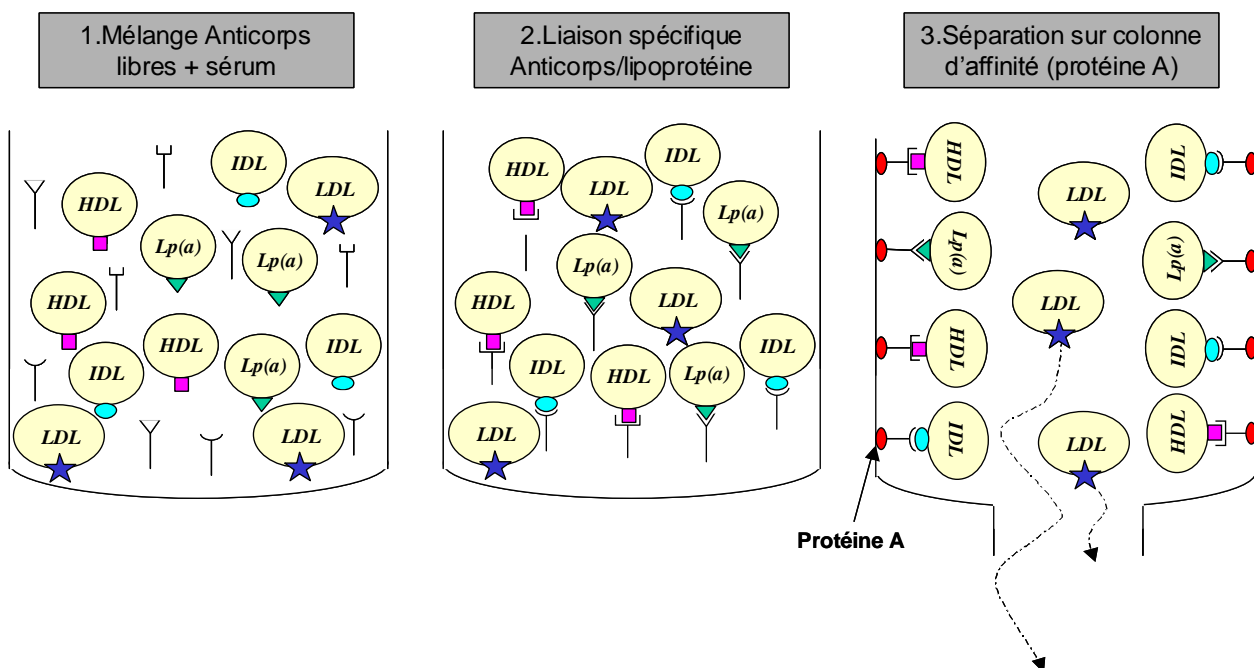


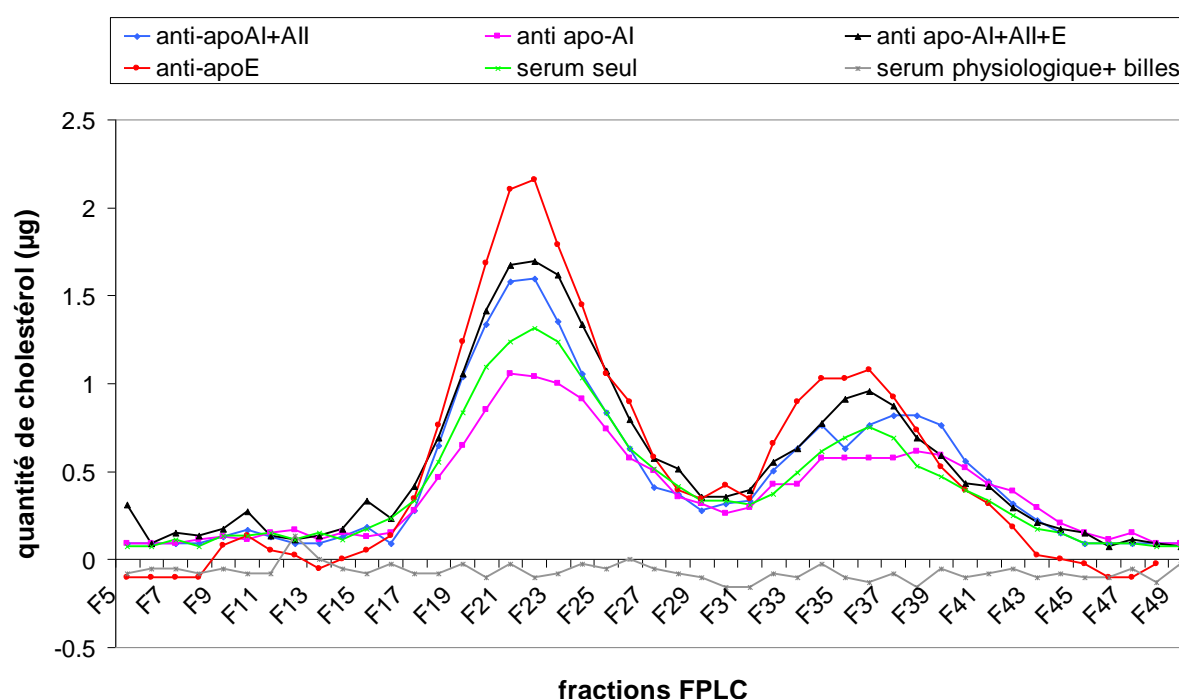
Figure 50 : Principe de l'immuno-affinité sur colonne de protéine A.

La dernière approche immunologique testée a consisté à utiliser une colonne d'affinité « HiTrap NHS-activated » (GE Healthcare, Suède) sur laquelle ont été fixés les anticorps <sup>I<sup>aire</sup></sup> anti-apoA-I. Le sérum a été injecté sur la colonne avec un tampon de fixation (20 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,15 mol/L NaCl, pH 7,4) à un débit de 0,2 mL/min et incubé 10 minutes. Les lipoprotéines fixées ont été éliminées avec un tampon à pH 3,0 composé d'acide acétique à 0,1 mmol/L. Des essais ont également été réalisés en simplifiant la matrice de sérum. Pour cela, 100 µL de sérum ont été préalablement injectés en FPLC et seules les fractions contenant les IDL, VLDL et LDL ainsi que les HDL de faible densité ont été injectées sur la colonne.

## 2. Résultats et Discussion

### 2.1. Purification de lipoprotéines à l'aide de microbilles fonctionnalisées

Différentes conditions ont été testées afin d'optimiser la purification des LDL. Une première série d'expériences a été réalisée en suivant les recommandations expérimentales du fabricant. Le protocole conseillé consistait à ajouter 20 µL de chaque solution de billes à 100 µL de sérum (Figure 51).



**Figure 51 : Essais réalisés avec différentes combinaisons de billes fonctionnalisées.**

20 µL d'anti apoAI+20 µL d'anti apoAll (bleu), 20 µL d'anti apoE (rouge), 20 µL d'anti apoAI (rose), 20 µL d'anti-apoAI+20 µL d'anti-apoAll+20 µL d'anti-apoE (noir) ont été ajoutés à 100 µL de sérum. la courbe verte correspond au sérum seul (témoin positif) et la courbe grise au témoin négatif.

Comme le montre la Figure 51, la proportion de cholestérol HDL (fractions 32 à 47) par rapport au cholestérol LDL (fractions 17 à 31) a été très peu modifiée après le traitement de l'échantillon par les microbilles fonctionnalisées supposées précipiter les HDL. Ceci qui indique que ces conditions ne permettent pas d'obtenir une fraction de LDL pures.

Les deux hypothèses les plus probables étaient que la quantité de billes n'était pas suffisante ou bien que une ou plusieurs protéines plasmatiques s'adsorbaient de manière non-spécifique aux billes et empêchaient l'interaction entre les apolipoprotéines et les anticorps présents à la surface des billes.

Des quantités décroissantes de sérum dilué dans du sérum physiologique ont alors été testées ainsi que des quantités croissantes de billes jusqu'à un très large excès d'anticorps comparé aux antigènes. Le taux de purification des LDL obtenu après avoir testé ces nombreuses conditions était très faible, de l'ordre de 5 %.

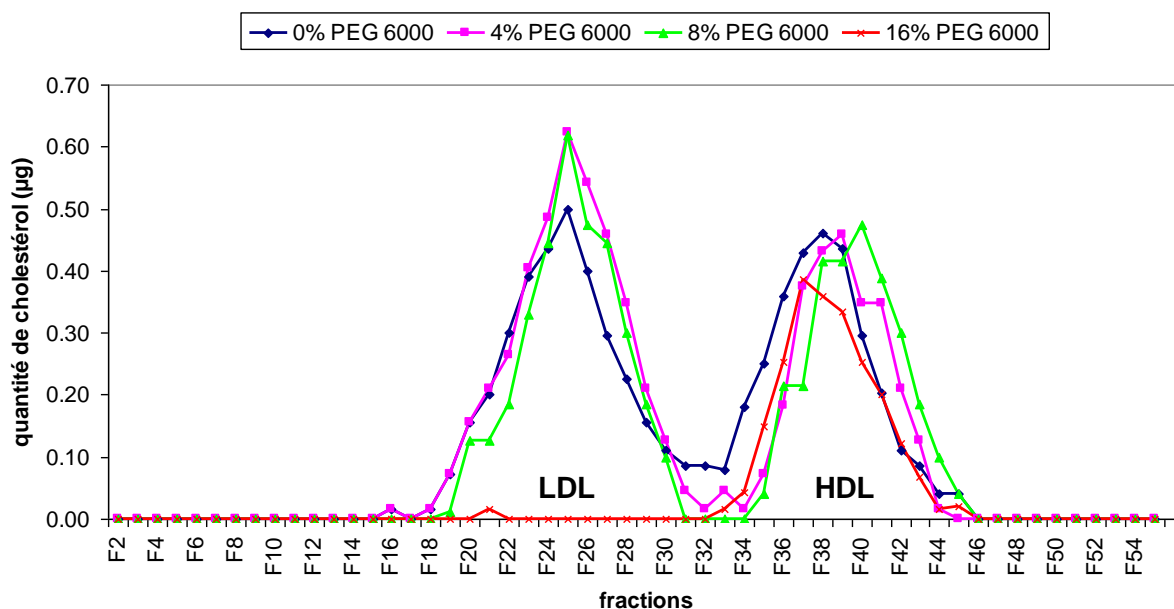
Différentes hypothèses pouvaient expliquer ce résultat décevant. Tout d'abord, il était possible qu'une ou plusieurs protéines présentes dans le sérum en très grande quantité (par exemple l'albumine) se fixent de manière non spécifique sur les billes et empêchent la liaison des anticorps avec les lipoprotéines cibles et ce malgré l'utilisation de très faibles volumes de sérum. Les billes ont donc été testées sur une matrice simplifiée correspondant à un échantillon de sérum dont les protéines plasmatiques ainsi qu'une partie des HDL ont été éliminées par ultracentrifugation et/ou FPLC. Néanmoins, cette stratégie n'a pas été fructueuse, suggérant que la saturation des billes par des interactions non spécifiques avec les protéines plasmatiques n'était pas la source du problème. Ensuite, il était envisageable que la technique de greffage des anticorps à la surface des billes ne soit pas adaptée et affectait leur affinité pour les lipoprotéines d'intérêt. C'est pourquoi de nouveaux essais ont été réalisés afin de vérifier cette hypothèse.

## **2.2. Purification de lipoprotéines via la formation de complexes d'anticorps primaires, secondaires et de PEG**

La seconde stratégie reposait sur l'utilisation d'anticorps libres afin de s'affranchir de tout problème lié à l'orientation et au nombre d'anticorps exposés à la surface des billes suite au greffage.

Dans un premier temps, des essais ont été réalisés afin d'optimiser la quantité de PEG 6000 à ajouter à l'échantillon de sérum sans pour autant déstabiliser les lipoprotéines. Pour cela 40 µL de tampon PEG 6000 à 4, 8 et 16 % ont été ajoutés à 80 µL de sérum. Un contrôle positif a été réalisé en ajoutant 40 µL de tampon physiologique à 80 µL de sérum.

Comme le montre la Figure 52, le pic correspondant aux LDL a disparu lorsque la solution utilisée contenait 16 % de PEG, suggérant qu'avec ce pourcentage élevé de PEG, la totalité des LDL était déstabilisée. Par la suite nous avons donc travaillé avec du PEG 8 %.

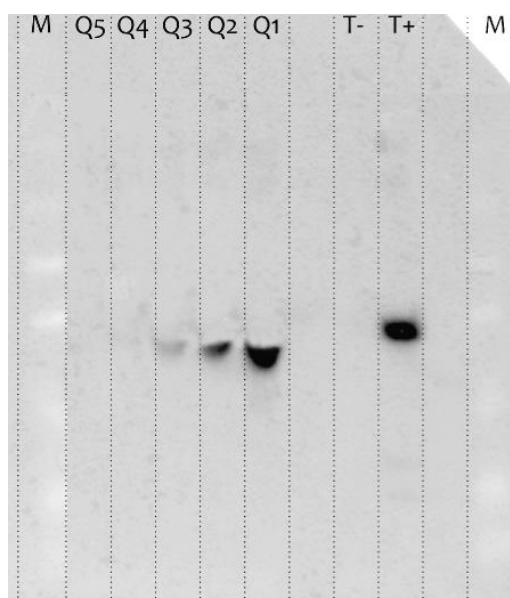


**Figure 52 : Effet d'une quantité croissante de PEG sur les HDL et LDL.**

Dans un premier temps, des essais ont été réalisés en utilisant des quantités décroissantes d'apoA-I allant de 1 µg à 0,1 µg et des quantités constantes d'anticorps anti-apoA-I, d'anticorps II<sup>aire</sup> dirigés contre les anticorps anti-apoA-I et de PEG 8 % afin de déterminer la quantité maximale d'apoA-I pouvant être éliminée par le complexe de précipitation (Tableau 23). Une élimination complète d'HDL a été observée pour une quantité d'apoA-I de 0,25 µg (Q4) avec 25 µg d'anticorps primaires et 32 µg d'anticorps secondaires (Figure 53). Une disparition quasi totale des HDL a également été observée avec une quantité d'apoA-I de 0,5 µg (Q5).

	T <sup>-</sup>	T <sup>+</sup>	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5
ApoA-I	0 µg	1 µg	1 µg	0,75 µg	0,50 µg	0,25 µg	0,10 µg
Anti-ApoA-I	25 µg	0 µg	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg
Anticorps II <sup>aire</sup>	32 µg	0 µg	32 µg	32 µg	32 µg	32 µg	32 µg
PEG 6000 8 %	20 µL	0 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL

**Tableau 23 : Conditions expérimentales utilisées lors des premiers essais d'immuno-précipitation.** (T<sup>+</sup> : témoin positif, T<sup>-</sup> : témoin négatif, Q1 à Q5 : essais avec des quantités décroissantes d'apoA-I)



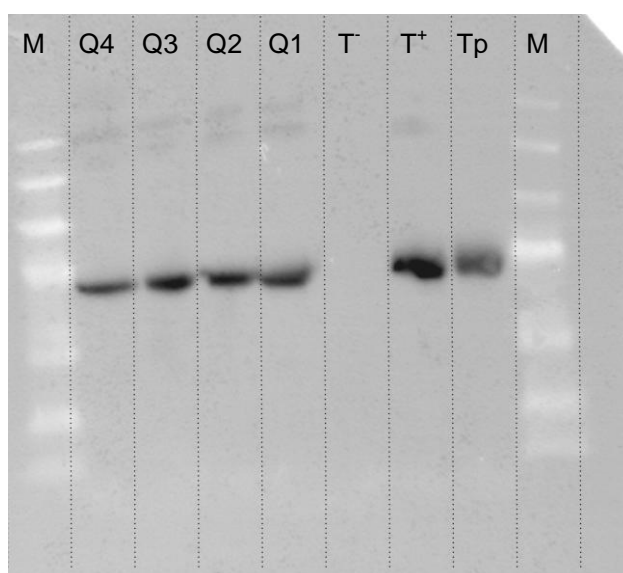
**Figure 53 : Western Blot réalisé avec des quantités décroissantes d'apoA-I.** (M : marqueur.)

Afin d'améliorer la précipitation des HDL, de nouveaux essais ont été réalisés en ajoutant une quantité croissante d'anticorps II<sup>aire</sup> à une quantité constante d'apoA-I et d'anticorps anti-apoA-I (Tableau 24). Après analyse par Western Blot, une bande correspondant à l'apoA-I était observée dans toutes les conditions (Figure 54). Aucune amélioration notable n'a donc été observée lorsque la quantité d'anticorps secondaires était augmentée. Les conditions optimales permettant d'éliminer 0,25 µg d'HDL présentes dans le sérum étaient donc 25 µg d'anticorps anti-apoA-I, 32 µg d'anticorps secondaires et 20 µL de PEG (Tableau 23).



	Tp	T <sup>-</sup>	T <sup>+</sup>	Q1	Q2	Q3	Q4
ApoA-I	0,75 µg	0 µg	0,75 µg	0,75 µg	0,75 µg	0,75 µg	0,75 µg
Anti-ApoA-I	0 µg	25 µg	0 µg	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg
Anticorps II <sup>aire</sup>	0 µg	32 µg	0 µg	32 µg	64 µg	128 µg	256 µg
PEG 6000 8 %	64 µL	64 µL	64 µL	64 µL	64 µL	64 µL	64 µL

**Tableau 24 : Conditions expérimentales utilisées afin de déterminer la quantité optimale d'anticorps II<sup>aires</sup>.** (*T<sup>-</sup> : témoin négatif, T<sup>+</sup> : témoin positif, Tp : tampon PEG, Q1 à Q4 : essais réalisés avec des quantités croissantes d'AC II<sup>aire</sup>*)



**Figure 54 : Western Blot réalisé avec des quantités croissantes d'anticorps II<sup>aires</sup>.** (*M : marqueur.*)

En parallèle, des analyses d'ID-GC/MS ont été réalisées afin de doser le cholestérol total avant et après précipitation en présence et en l'absence de PEG. Ces analyses ont permis d'évaluer l'élimination des HDL en dosant le cholestérol qui leur était associé mais également de vérifier que le PEG n'interférait pas avec la méthode par ID-GC/MS. Pour un échantillon contenant 5 µg de cholestérol, la présence de PEG a permis d'éliminer 40 % de cholestérol. Une diminution de 8 % était observée lorsque l'échantillon contenait initialement 10 µg de cholestérol. Les essais ont été

reproduits le jour suivant. Dans ce cas, la présence de PEG a entraîné une diminution de 12 % à partir de l'échantillon contenant 5 µg de cholestérol et de 3 % pour l'échantillon contenant 10 µg. Ces analyses ont mis en évidence des différences significatives mais non reproductibles entre les échantillons contenant et ne contenant pas de PEG 8 %. Ceci laisse supposer une interférence du PEG dans le dosage du cholestérol par ID-GC/MS. Une alternative, permettant de s'affranchir du PEG, a été l'utilisation d'anticorps libres et d'une colonne d'affinité composée de protéine A.

## 2.3. Purification de lipoprotéines par colonnes d'affinité

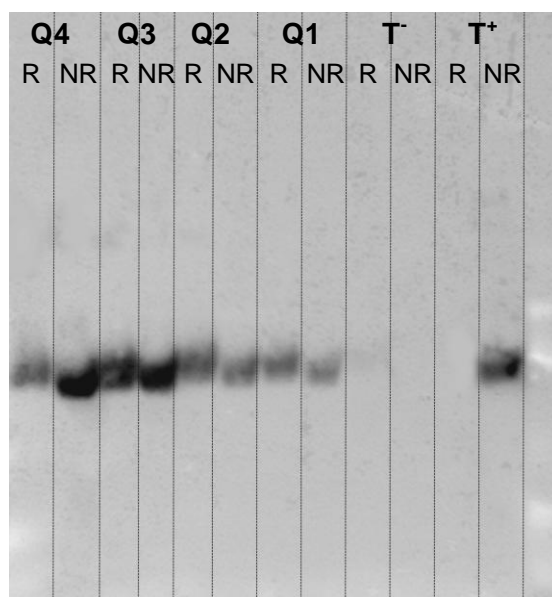
### 2.3.1. Colonne d'affinité fonctionnalisée avec la protéine A

Les premiers essais sur colonnes de protéine A ont été réalisés dans des conditions expérimentales proches des conditions favorables observées dans l'approche par immuno-précipitation (Tableau 25).

Après passage sur colonne, les fractions retenues et non-retenues ont été analysées par Western Blot (Figure 55). L'élimination totale des HDL n'a pu être observée quelle que soit la quantité initiale d'apoA-I utilisée, même à de très faibles concentrations. De plus, une augmentation proportionnelle de la fixation a été observée lorsque la concentration en ApoA-I était plus importante. Ces résultats indiquaient que les anticorps présents sur la colonne n'étaient pas saturés.

	T <sup>-</sup>	T <sup>+</sup>	Q1	Q2	Q3	Q4
ApoA-I	0 µg	0,75 µg	0,1 µg	0,25 µg	0,50 µg	0,75 µg
Anti-ApoA-I	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg
Tampon de fixation	35 µL	35 µL	35 µL	35 µL	35 µL	35 µL

**Tableau 25 : Conditions expérimentales utilisées lors des premiers essais sur colonne de protéine A.** (*T<sup>-</sup> : témoin négatif, T<sup>+</sup> : témoin positif, Q1 à Q4 : essais avec des quantités croissantes d'apoA-I*)



**Figure 55 : Western Blot réalisé sur les fractions retenues (R) et non-retenues (NR) sur la colonne de protéine A.**

Afin d'améliorer la fixation des complexes constitués de HDL et d'anticorps anti-apoA-I, différentes conditions d'incubation des anticorps primaires avec le sérum ont été testées, comme par exemple 1 heure à 37°C ou une nuit à 4°C. Le débit a également été diminué jusqu'à 0,1 mL/min et le mélange de sérum et d'anticorps incubé 10 minutes sur la colonne de protéine A afin de favoriser l'interaction entre les complexes et la colonne. Les fractions retenues et non retenues sur la colonne ont été analysées par Western Blot. Quelles que soient les conditions utilisées, aucune amélioration de la purification n'a été observée et les résultats étaient très similaires à ceux obtenus sur la Figure 55. Les HDL étaient présentes dans la fraction retenue mais aussi dans celle non retenue ce qui témoigne d'une purification incomplète. L'hypothèse alors émise était que les complexes étaient trop volumineux et se fixaient difficilement sur la colonne. Pour s'en affranchir, des essais ont été réalisés en fixant les anticorps primaires anti-apoA-I directement sur une colonne.

### **2.3.2. Colonne fonctionnalisée avec des anticorps primaires anti-apoA-I**

Dans un premier temps, des essais ont été réalisés en utilisant une gamme de sérum dilué. Pour cela 10 µL, 20 µL et 30 µL de sérum ont été dilués dans le tampon de fixation à un volume final de 500 µL. Les fractions retenues et non-retenues ont été analysées par Western Blot et par ID-GC/MS. Tout comme les résultats obtenus avec la colonne de protéine A, les résultats de Western Blot ont montré une diminution de la fixation lorsque les échantillons étaient dilués démontrant qu'il

n'y avait pas de saturation des anticorps. Concernant les analyses par ID-GC/MS, les concentrations de cholestérol mesurées dans les fractions retenues et non-retenues ont permis de calculer un rapport correspondant au HDL-C (fractions retenues) sur le non HDL-C (fractions non-retenues). Les rapports ainsi déterminés étaient compris entre 0,02 et 0,03 et étaient donc très éloignés du ratio théorique de 0,5 correspondant à une élimination complète des HDL.

Afin de s'assurer que la purification incomplète n'était pas due à la présence de protéines plasmatiques abondantes dans les échantillons de sérum, des essais ont été réalisés sur des échantillons de matrice simplifiée par FPLC. Dans ce cas, aucune amélioration de la fixation n'a été observée et des HDL étaient toujours présentes dans la fraction non-retenue. L'hypothèse la plus probable était que les problèmes de fixation étaient dus non pas à des interférences mais à un problème d'accessibilité des épitopes à la surface des lipoprotéines.

### 3. Conclusion

En conclusion, les taux de purification des LDL obtenus par les différentes approches d'immuno-séparation se sont révélés peu concluants et très éloignés de ceux obtenus par Pisani *et collaborateurs* avec la méthode de Genzyme Diagnostics [131]. En effet, la concentration mesurée sur le même échantillon de sérum par  $\beta$ -quantification ( $3,6 \pm 1,4$  mmol/L) n'était pas significativement différente de celle déterminée avec leur approche immunologique ( $3,7 \pm 1,4$  mmol/L).

Les différents résultats obtenus semblent suggérer que les sites antigéniques reconnus par les anticorps sont partiellement masqués dans le cœur hydrophobe des lipoprotéines et donc non accessibles. Cette hypothèse est d'autant plus vraisemblable que la plupart des techniques immunologiques utilisées en routine utilisent des détergents pour augmenter l'accessibilité des sites antigéniques. Néanmoins, l'utilisation de détergents ne semble pas adaptée car cela pourrait engendrer des pertes de cholestérol, conduisant à des résultats négativement biaisés.



## ***CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES***



## ***Importance des méthodes de référence et des MRC pour l'évaluation de la justesse***

Afin d'évaluer la justesse des méthodes utilisées par les laboratoires de biologie médicale, il est important de disposer de méthodes de référence primaires. Le premier objectif de la thèse a ainsi consisté à valider des méthodes de référence d'ordre supérieur pour le dosage du cholestérol total, des triglycérides, du HDL-cholestérol et du LDL-cholestérol.

Ces différentes méthodes ont ensuite permis d'assigner des valeurs de référence à des échantillons de contrôle externe de la qualité. Les résultats obtenus, notamment pour le cholestérol total et les triglycérides aux concentrations basses, ont montré qu'un biais systématique de la majorité des méthodes de routine entraînait un biais sur la valeur consensuelle (moyenne des résultats de tous les laboratoires). Ceci a pour conséquence une évaluation erronée de la justesse. Ces résultats ont donc démontré la valeur ajoutée des valeurs assignées à l'aide d'une méthode de référence.

Cependant, afin d'évaluer rigoureusement la justesse des méthodes de routine, disposer de méthodes de référence n'est pas suffisant. Il est tout aussi important de disposer de matériaux de référence certifiés (MRC) commutables. Afin de répondre à ce besoin, l'originalité de cette thèse a reposé sur la caractérisation et l'évaluation de la commutabilité d'un MRC développé au laboratoire. En effet, l'organisation d'une étude de commutabilité impliquant un aussi grand nombre de laboratoires (37) pour l'évaluation simultanée de quatre analytes n'avait jamais été entreprise auparavant.

Ce MRC est composé de deux pools de sérum congelés de deux niveaux différents de concentration et est certifié en cholestérol total, LDL-cholestérol, HDL-cholestérol et triglycérides. Il a pour vocation d'être utilisé à la fois comme vérification de l'étalonnage des méthodes commercialisées par les fabricants de produits de diagnostic *in vitro* mais également comme échantillon de contrôle de la qualité permettant d'évaluer la justesse des méthodes de routine. Pour cela, il était indispensable que le MRC soit commutable, c'est-à-dire qu'il se comporte comme des échantillons natifs de patients. L'organisation de l'étude de commutabilité a permis de démontrer que le MRC était commutable pour la majorité des méthodes de routine utilisées pour mesurer ces quatre biomarqueurs.

Le MRC a ensuite été utilisé afin d'évaluer la justesse des méthodes de routine pour lesquelles il a été trouvé commutable. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence une surestimation de la concentration en cholestérol total et une sous-estimation de la concentration en triglycérides d'autant plus importante que cette dernière était faible. Concernant le dosage du HDL-cholestérol,



les résultats de notre étude indiquaient que la majorité des méthodes de dosage avaient des biais inférieurs ou proches des critères d'acceptabilité établis par le NCEP.

Les biais de chacun de ces 3 analytes ont pour conséquence une surestimation de la concentration en LDL-cholestérol lorsqu'elle est calculée par l'équation de Friedewald. Une surestimation de la concentration en LDL-cholestérol a également été mise en évidence pour la majorité des méthodes directes. Un effet de la concentration, se traduisant par un biais plus important au niveau des concentrations les plus élevées, a également été observé.

Ce surdosage a d'importantes conséquences sur la prise en charge des patients dyslipidémiques, notamment à des concentrations proches du seuil décisionnel où un certain nombre de patients seront considérés dyslipidémiques à tort.

Nous avons également identifié deux paramètres majeurs ayant un impact sur l'évaluation de la commutabilité : les lots de réactifs ou d'étalons utilisés et la variabilité inter-échantillons. Il est donc important de disposer à la fois de méthodes et d'échantillons représentatifs de la grande hétérogénéité des échantillons rencontrée en routine.

L'idéal serait d'évaluer la commutabilité d'un échantillon pour chaque référence de lot réactif et/ou étalon pour une méthode donnée. Cependant cela est impossible à entreprendre du fait du nombre extrêmement important de combinaisons de numéros de lot (réactif et étalon) pouvant être utilisées. La principale difficulté sera donc de sélectionner des laboratoires représentatifs de leur groupe de pairs. A l'avenir, une possibilité serait de coordonner l'envoi des échantillons de l'étude de commutabilité avec l'envoi de nouveau lot par les fabricants de diagnostic *in vitro*.

Par ailleurs, le choix des échantillons est également déterminant. En effet, les différences constatées entre les biais calculés à partir des résultats obtenus avec les méthodes de dosage du LDL-cholestérol et du HDL-cholestérol et ceux reportés dans la littérature ont été attribuées à l'importante variabilité entre les échantillons utilisés. Nos résultats ont confirmé que les performances des méthodes dépendaient fortement des propriétés des matériaux, même lorsqu'ils sont commutables, rendant difficile le choix d'échantillons représentatifs.

La principale conséquence de ces variabilités inter-échantillons a été l'obtention d'intervalles de confiance plus larges lors de l'évaluation de la commutabilité. Dans ce cas, la probabilité qu'un échantillon soit identifié comme étant commutable est plus importante. De plus, pour plusieurs échantillons commutables, les degrés de commutabilité pourraient être très différents et entraîner une importante variation du biais méthode en fonction de l'échantillon utilisé. Il serait donc préférable d'utiliser plusieurs échantillons représentatifs. De plus, baser les critères d'acceptabilité de commutabilité uniquement sur une approche statistique ne semble pas approprié. Il serait nécessaire d'adapter ces critères en fonction de l'utilisation du matériau qualifié. Par exemple, les critères fixés pour un étalon devraient être plus stricts que ceux pour un échantillon de contrôle de la qualité du fait de l'augmentation de ses incertitudes le long de la chaîne de traçabilité.

Pour une évaluation rigoureuse de la justesse des méthodes directes de dosage du LDL-cholestérol, il serait également souhaitable de disposer d'une méthode de référence plus spécifique que la  $\beta$ -quantification. En effet, certaines méthodes de routine ne mesurent pas l'IDL-cholestérol ou seulement une partie du cholestérol associé aux IDL ou Lp(a). Or, la  $\beta$ -quantification ne donne accès qu'à la somme du cholestérol présent à la fois dans les LDL, les IDL et la Lp(a).

Afin de répondre à ce besoin, des approches immunologiques ont été mises au point au laboratoire. Leur principe repose sur la différence de composition en apolipoprotéines suivant les lipoprotéines et utilisait des anticorps spécifiques dirigés contre ces différentes apolipoprotéines. Il s'agit de la seule approche permettant une élimination complète de la Lp(a). En effet, une séparation basée sur les différences de densité entre les lipoprotéines ne permettra pas une élimination totale, la densité des LDL étant comprise entre 1,019 et 1,063 et celle de la Lp(a) entre 1,055 et 1,12. A l'heure actuelle, les premiers essais n'ont permis qu'une purification partielle des lipoprotéines, ce qui pourrait s'expliquer par une mauvaise accessibilité des épitopes du fait de la faible exposition des protéines à la surface des lipoprotéines. Une alternative qui pourrait être envisagée serait l'utilisation d'anticorps primaires monoclonaux dirigés spécifiquement contre les régions des apolipoprotéines exposées à la surface des lipoprotéines.

Il serait possible de modifier le protocole initial de  $\beta$ -quantification en réalisant une étape d'ultracentrifugation à une densité non pas de 1,006 mais de 1,019, ce qui permettrait de soustraire l'IDL-cholestérol et ainsi disposer d'une méthode mesurant le cholestérol associé aux LDL et à la Lp(a).

Il est également important de disposer de méthodes de référence non sensibles aux effets de matrice, comme les méthodes de référence par dilution isotopique. Cela est notamment important lors de l'évaluation de la commutabilité d'un échantillon. En effet, lorsque la commutabilité est évaluée en comparant deux méthodes sensibles aux effets de matrice (par exemple deux méthodes de routine) un matériau non commutable pourra être trouvé commutable si les effets de matrice sont identiques.

La  $\beta$ -quantification n'utilisant pas un étalonnage interne, elle est potentiellement sensible aux effets de matrice. En effet, ajouter une quantité connue d'étalon interne dès les premières étapes du protocole permettrait de corriger les effets engendrés par des interférences et par de potentiels traitements subis par l'échantillon pouvant modifier la matrice. Il serait donc souhaitable de disposer de LDL marquées.

Une première possibilité serait de marquer les esters de cholestérol présents au sein des LDL. Pour cela, du cholestérol marqué aux isotopes stables serait incubé avec des HDL et des LDL en présence des protéines LCAT et CETP. Le cholestérol marqué serait ensuite incorporé au sein des HDL puis des LDL. Les LDL marquées pourraient être utilisées comme étalon interne afin de quantifier le LDL-cholestérol par dilution isotopique.

Une autre possibilité serait de marquer les LDL au niveau de l'apoB100 par marquage *in vivo* des lipoprotéines ou par l'approche SILAC (« Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture »).

Une alternative plus simple et moins coûteuse pourrait également être l'utilisation d'un fluorochrome. Le rendement de purification relatif serait ensuite calculé grâce à la mesure de la fluorescence avant et après les différentes étapes du protocole analytique.

## ***Recommandations générales***

Ces travaux de thèse ont permis d'établir des recommandations pour les principaux acteurs des analyses biomédicales.

Dans la mesure du possible, il est recommandé aux fabricants de produits de diagnostic *in vitro* d'améliorer la robustesse des procédés de fabrication des différents lots de réactifs et d'étalons. La principale difficulté est cependant due à la grande variété de mécanismes pouvant être impliqués dans les méthodes de dosage développées. Ceci a pour conséquence de rendre difficile la fabrication de réactifs dont les caractéristiques sont les plus proches possible d'un lot à un autre. Par exemple, dans le cas du HDL-cholestérol, des réactions enzymatiques ainsi que des réactions de protection/déprotection des lipoprotéines ou des réactions faisant intervenir des anticorps polyclonaux peuvent être utilisées.

La robustesse des procédés de fabrication des étalons est également un paramètre critique qu'il serait souhaitable de mieux maîtriser. De plus, la commutabilité des étalons n'étant actuellement pas évaluée, il est possible qu'un lot d'étalon soit commutable alors que le suivant ne le sera pas. Cependant, il serait beaucoup trop compliqué d'évaluer la commutabilité de tous les étalons utilisés lors des raccordements successifs à la chaîne de traçabilité, c'est-à-dire les étalons de travail et les étalons produits par le fabricant. Dans ce cas, la chaîne de traçabilité pourrait être rompue par la non commutabilité des matériaux. Afin d'éviter cela, une possibilité serait d'évaluer uniquement la commutabilité de l'étalon secondaire. Cet échantillon, lorsqu'il est commutable, pourrait ensuite être utilisé pour vérifier que la méthode de routine n'a pas été biaisée par l'utilisation, au cours du processus de développement, d'un matériau non-commutable. Afin de minimiser la possibilité d'avoir des étalons non commutables, il serait également souhaitable de leur faire subir un minimum de traitements durant leur procédé de fabrication. A l'heure actuelle il n'existe qu'une procédure permettant de fabriquer des matériaux commutables pour le dosage du cholestérol. Cette procédure, décrite dans le document NCCLS C37-A, peut être appliquée à d'autres biomarqueurs tant que de documents plus spécifiques ne sont pas établis.

Au vue des résultats observés, il serait souhaitable que les laboratoires de biologie médicale vérifient ponctuellement la justesse de leurs méthodes à l'aide de MRC commutables, lorsque cela

est possible. Il leur est également conseillé d'être vigilant quant à la valeur cible utilisée lors des évaluations externes de la qualité auxquelles ils participent. En effet, il serait préférable que ces valeurs soient attribuées par des méthodes de référence.

Concernant les organisateurs d'essais d'aptitude, une des principales perspectives de cette thèse serait de généraliser l'utilisation des valeurs cibles déterminées par une méthode de référence ainsi que d'échantillons de contrôle de la qualité commutables.

Ces travaux proposent cependant des solutions permettant d'évaluer la justesse lorsque les échantillons de contrôle ne sont pas commutables. L'approche de correction de non commutabilité développée permet dans certaines conditions une détermination quantitative des effets de matrice qu'il est donc possible de soustraire. Pour cela il existe deux différentes méthodes reposant sur l'utilisation d'une régression linéaire, ou sur une approche par « plage de concentrations », lorsque le biais de la méthode de routine évaluée n'est pas proportionnel sur l'ensemble de la gamme de concentration.

Pour finir, il serait également important que les laboratoires de métrologie continuent de développer de nouvelles méthodes de référence pour des biomarqueurs présentant un intérêt élevé en biologie clinique et pour lesquels un apport métrologique constituerait une réelle valeur ajoutée.

L'évaluation de la commutabilité doit être généralisée et étendue à un maximum de biomarqueurs utilisés en biologie médicale. La prise de conscience du milieu scientifique et métrologique sur l'importance de la commutabilité est notamment démontrée par le fait que la révision de la norme NF EN ISO 17511 prévoit de l'inclure dans l'établissement de la chaîne de traçabilité métrologique. Un groupe de travail IFCC regroupant des experts internationaux du domaine a également été créé il y a peu de temps et a pour principal objectif d'initier des actions de standardisation à l'échelle internationale afin d'atteindre un consensus sur l'évaluation de la commutabilité.



## ***BIBLIOGRAPHIE***



1. The Lewin group, Inc. (2005) The Value of Diagnostics Innovation, Adoption and Diffusion into Health Care.
2. Williams G (2002) The assessment of the economic role of measurements and testing in modern society. European Measurement Project funded under the GROWTH Programme by the DG-Research of the European Commission 181–195.
3. Sécurité Sociale Les chiffres clés de la sécurité sociale 2012.
4. Cour des comptes (2013) La biologie médical. Article LO 132-3-1 du code des juridictions financières.
5. Ministère de la santé et des sports (2010) Ordonnance n°2010-49 relative à a biologie médicale.
6. Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale modifié par l'arrêté du 26 avril 2002 (2002). GBEA (Guide de Bonne Exécution des Analyses)
7. Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale [SH-REF-02]. (2010) COFRAC, Révision 00
8. Guide technique d'accréditation de vérification (Portée A)/ validation des méthodes en biologie médicale (Portée B) [SH-GTA-04]. (2011) COFRAC, <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>
9. ISO/IEC 17025 (2005) Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais.
10. NF EN ISO 15189 (2007) Laboratoires d'analyses de biologie médicale -- Exigences particulières concernant la qualité et la compétence.
11. Règlement d'accréditation. (2010) COFRAC, Document LAB-REF-05 <http://www.cofrac.fr/documentation/LAB-REF-05>
12. NF EN ISO 9001(2008) Systèmes de management de la qualité -- Exigences.
13. N.Marchal (1998) La démarche qualité au laboratoire de biologie médicale. Archives Institut Pasteur Madagascar 64:85–87.
14. Vassault A, Grafmeyer D, Graeve J de, et al. (1999) Analyses de biologie médicale: spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques. Annales de Biologie Clinique 57:685–95.
15. Vocabulaire international de métrologie - Concepts fondamentaux et généraux et termes associés (VIM). Guide ISO/CEI 99: 2007
16. Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale [SH-GTA-14]. (2010) COFRAC, Révision 00
17. ISO/IEC Guide 98-3 (2008) Incertitude de mesure -- Partie 3: Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure (GUM:1995).
18. NF EN ISO 17511(2003) Dispositifs médicaux de diagnostic in vitro -- Mesurage des grandeurs dans des échantillons d'origine biologique -- Traçabilité métrologique des valeurs attribuées aux agents d'étalonnage et aux matériaux de contrôle.



19. Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on In Vitro Diagnostic Medical Device. 1–37.
20. Fasce CF, Rej R, Copeland WH, Vanderlinde RE (1973) A Discussion of Enzyme Reference Materials: Applications and Specifications. *Clinical Chemistry* 19:5–9.
21. Rej R, Jenny RW, Bretaudiere J-P (1984) Quality control in clinical chemistry: characterization of reference materials. *Talanta* 31:851–862.
22. Vesper HW, Miller WG, Myers GL (2007) Reference Materials and Commutability. *Clinical Biochemist Review* 28:139–147.
23. Zegers I, Beetham R, Keller T, et al. (2013) The Importance of Commutability of Reference Materials Used as Calibrators: The Example of Ceruloplasmin. *Clinical Chemistry* 59:1322–1329.
24. Miller WG (2000) Matrix effects in the measurement and standardization of lipids and lipoproteins. In: Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH (ed) *Handbook of lipoprotein testing* 2<sup>nd</sup> Edition. AACC, pp 695–716
25. NF EN ISO 17511(2003) In vitro diagnostic medical devices -- Measurement of quantities in biological samples -- Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials.
26. Eckfeldt JH, Copeland KR (1993) Accuracy verification and identification of matrix effects. *Archives of pathology & laboratory medicine* 117:381–386.
27. Cattozzo G, Franzini C, d' Eril GM (2001) Commutability of Calibration and Control Materials for Serum Lipase. *Clinical Chemistry* 47:2108–2113.
28. Cattozzo G, Franzini C, d' Eril GM (2001) Commutability of Calibration and Control Materials for Serum Lipase. *Clinical Chemistry* 47:2108–2113.
29. Libeer JC, Hamers N (1994) Factitiously low urate recoveries in control sera with the Beckman Synchron Systems. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation* 54:485–486.
30. Kroll MH, Chesler R, Elin RJ (1989) Effect of lyophilization on results of five enzymatic methods for cholesterol. *Clinical Chemistry* 35:1523–1526.
31. Uldall A, Glavind-Kristensen S, Bak S (1989) Preparation of fresh frozen human sera for external quality assessment. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation* 49:11–14.
32. Marcovina SM, Adolphson JL, Parlavecchia M, Albers JJ (1990) Effects of lyophilization of serum on the measurement of apolipoproteins A-I and B. *Clinical Chemistry* 36:366–369.
33. NCCLS document C37-A. Preparation and validation of commutable frozen human serum pools as secondary reference materials for cholesterol measurement procedures; Approved guidelines. (1999) Wayne, PA USA: NCCLS.
34. Cobbaert C, Weykamp C, Baadenhuijsen H, et al. (2002) Selection, Preparation, and Characterization of Commutable Frozen Human Serum Pools as Potential Secondary Reference Materials for Lipid and Apolipoprotein Measurements: Study within the Framework of the Dutch Project "Calibration 2000." *Clinical Chemistry* 48:1526–1538.
35. CLSI document C53-A. Characterization and Qualification of Commutable Reference Materials for Laboratory Medicine; Approved guidelines. (2010) Wayne, PA USA: CLSI.

36. Carobene A, Ferrero C, Ceriotti F, et al. (1997) Creatinine measurement proficiency testing: assignment of matrix-adjusted ID GC-MS target values. *Clinical Chemistry* 43:1342–1347.
37. Delatour V, Lalere B, Saint-Albin K, et al. (2012) Continuous improvement of medical test reliability using reference methods and matrix-corrected target values in proficiency testing schemes: Application to glucose assay. *Clinica Chimica Acta* 413:1872–1878.
38. Ross JW, Myers GL, Gilmore BF, et al. (1993) Matrix effects and the accuracy of cholesterol analysis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 117:393–400.
39. Miller WG (2003) Specimen materials, target values and commutability for external quality assessment (proficiency testing) schemes. *Clinica Chimica Acta* 327:25–37.
40. Ross JW, Myers GL, Gilmore BF, et al. (1993) Matrix effects and the accuracy of cholesterol analysis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 117:393–400.
41. Leech DP (2000) The Economic Impacts of NIST Cholesterol Standards Program. National Institute Of Standards and Technology (NIST)
42. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *The Journal of clinical investigation* 34:1345–1353.
43. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Ray K, et al. (2010) Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *European Heart Journal* 31:2844–2853.
44. Carmena R, Duriez P, Fruchart J-C (2004) Atherogenic Lipoprotein Particles in Atherosclerosis. *Circulation* 109:III–2–III–7.
45. Dati F, Tate JR (2002) Reference materials for the standardization of the apolipoproteins AI and B, and lipoprotein(a). *JIFCC* 13 n°3
46. Lagrost L. MD (2003) Lipoprotéine et métabolisme lipidique. *L'athérosclérose-physiologie, diagnostics, thérapeutiques*
47. Olofsson SO, Asp L, Borén J (1999) The assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Current Opinion in Lipidology* 10:341–346.
48. Gordon DA (1997) Recent advances in elucidating the role of the microsomal triglyceride transfer protein in apolipoprotein B lipoprotein assembly. *Current Opinion in Lipidology* 8:131–137.
49. Hussain MM, Strickland DK, Bakillah A (1999) The mammalian low-density lipoprotein receptor family. *Annual Review of Nutrition* 19:141–172.
50. Sabesin SM, Frase S (1977) Electron microscopic studies of the assembly, intracellular transport, and secretion of chylomicrons by rat intestine. *Journal of Lipid Research* 18:496–511.
51. Brown MS, Goldstein JL (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232:34–47.
52. Glomset JA (1968) The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *Journal of Lipid Research* 9:155–167.
53. Zhao Y, Van Berkel TJ, Van Eck M (2010) Relative roles of various efflux pathways in net cholesterol efflux from macrophage foam cells in atherosclerotic lesions: *Current Opinion in Lipidology* 21:441–453.

54. Jian B, Llera-Moya M de la, Ji Y, et al. (1998) Scavenger Receptor Class B Type I as a Mediator of Cellular Cholesterol Efflux to Lipoproteins and Phospholipid Acceptors. *The Journal of Biological Chemistry* 273:5599–5606.
55. Jonas A (2000) Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim Biophys Acta* 1529:245–256.
56. OMS <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/fr/index.html>.
57. Gervois P, Balduyck M, Brousseau T (2008) Maladies cardiovasculaires: marqueurs de l'athérosclérose, de la maladie coronarienne et de l'accident vasculaire cérébral. In: Durand G, Beaudoux J-L (eds) *Biochimie médicale : marqueurs actuels et perspectives*. EM inter, pp 99–114
58. Ferrières J, Ruidavets JB, Perret B, et al. (2005) [Prevalence of dyslipidaemias in a representative sample of the French population]. *Archives des Maladies du Cœur et des Vaisseaux* 98:127–132.
59. Prospective Studies Collaboration, Lewington S, Whitlock G, et al. (2007) Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. *Lancet* 370:1829–1839.
60. (1995) Cholesterol, diastolic blood pressure, and stroke: 13,000 strokes in 450,000 people in 45 prospective cohorts. Prospective studies collaboration. *Lancet* 346:1647–1653.
61. The Emerging Risk Factors Collaboration (2009) Lipoprotein(a) concentration and the risk of coronary heart disease, stroke, and nonvascular mortality. *JAMA* 302:412–423.
62. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, et al. (1989) High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 79:8–15.
63. Collaboration APCS (2004) Serum Triglycerides as a Risk Factor for Cardiovascular Diseases in the Asia-Pacific Region. *Circulation* 110:2678–2686.
64. Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, et al. (2007) Triglycerides and the Risk of Coronary Heart Disease 10 158 Incident Cases Among 262 525 Participants in 29 Western Prospective Studies. *Circulation* 115:450–458.
65. Sever PS, Dahlöf B, Poulter NR, et al. (2003) Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial--Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 361:1149–1158.
66. Serruys P, de Feyter P, Macaya C, et al (2002) Fluvastatin for prevention of cardiac events following successful first percutaneous coronary intervention: A randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association* 287:3215–3222.
67. Downs JR, Clearfield M, Weis S, et al. (1998) Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA* 279:1615–1622.
68. (1998) Prevention of Cardiovascular Events and Death with Pravastatin in Patients with Coronary Heart Disease and a Broad Range of Initial Cholesterol Levels. *New England Journal of Medicine* 339:1349–1357.

69. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FAH, et al. (2008) Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *New England Journal of Medicine* 359:2195–2207.
70. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group (1994) Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *The Lancet* 344:1383–1389.
71. Law MR (2003) Quantifying effect of statins on low density lipoprotein cholesterol, ischaemic heart disease, and stroke: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 326:1423–0.
72. Serruys PC, de Feyter P, Macaya C, et al (2002) Fluvastatin for prevention of cardiac events following successful first percutaneous coronary intervention: A randomized controlled trial. *JAMA* 287:3215–3222.
73. Nordestgaard BG, Nielsen LB (1994) Atherosclerosis and arterial influx of lipoproteins. *Current Opinion in Lipidology* 5:252–257.
74. Williams KJ, Tabas I (1995) The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 15:551–561.
75. Gimbrone MA Jr (1999) Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis. *Thromb Haemost* 82:722–726.
76. Borén J, Gustafsson M, Skålen K, et al. (2000) Role of extracellular retention of low density lipoproteins in atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology* 11:451–456.
77. Carew TE, Pittman RC, Marchand ER, Steinberg D (1984) Measurement in vivo of irreversible degradation of low density lipoprotein in the rabbit aorta. Predominance of intimal degradation. *Arteriosclerosis* 4:214–224.
78. Schultz D, Harrison DG (2000) Quest for Fire: Seeking the Source of Pathogenic Oxygen Radicals in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 20:1412–1413.
79. Steinberg D (1997) Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 95:1062–1071.
80. Ross R (1999) Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *New England Journal of Medicine* 340:115–126.
81. Tedgui A, Chapman J (2004) pathogénèse de l'athérosclérose: théories et mécanismes. *NSFA*
82. Guérin M, Le Goff W, Lassel TS, et al. (2001) Atherogenic role of elevated CE transfer from HDL to VLDL(1) and dense LDL in type 2 diabetes: impact of the degree of triglyceridemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 21:282–288.
83. Nigon F, Lesnik P, Rouis M, Chapman MJ (1991) Discrete subspecies of human low density lipoproteins are heterogeneous in their interaction with the cellular LDL receptor. *The Journal of Lipid Research* 32:1741–1753.
84. Packard CJ (1999) Understanding coronary heart disease as a consequence of defective regulation of apolipoprotein B metabolism. *Current Opinion in Lipidology* 10:237–244.

85. Tkác I, Kimball BP, Lewis G, et al. (1997) The Severity of Coronary Atherosclerosis in Type 2 Diabetes Mellitus Is Related to the Number of Circulating Triglyceride-Rich Lipoprotein Particles. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17:3633–3638.
86. Hodis HN, Mack WJ, Azen SP, et al. (1994) Triglyceride- and cholesterol-rich lipoproteins have a differential effect on mild/moderate and severe lesion progression as assessed by quantitative coronary angiography in a controlled trial of lovastatin. *Circulation* 90:42–49.
87. Phillips NR, Waters D, Havel RJ (1993) Plasma lipoproteins and progression of coronary artery disease evaluated by angiography and clinical events. *Circulation* 88:2762–2770.
88. Nielsen LB (1999) Atherogenicity of lipoprotein(a) and oxidized low density lipoprotein: insight from in vivo studies of arterial wall influx, degradation and efflux. *Atherosclerosis* 143:229–243.
89. Bdeir K, Cane W, Canziani G, et al. (1999) Defensin promotes the binding of lipoprotein(a) to vascular matrix. *Blood* 94:2007–2019.
90. Lundstam U, Hurt-Camejo E, Olsson G, et al. (1999) Proteoglycans contribution to association of Lp(a) and LDL with smooth muscle cell extracellular matrix. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19:1162–1167.
91. Hervio L, Chapman MJ, Thillet J, et al. (1993) Does apolipoprotein(a) heterogeneity influence lipoprotein(a) effects on fibrinolysis? *Blood* 82:392–397.
92. Pan S, Kleppe LS, Witt TA, et al. (2004) The effect of vascular smooth muscle cell-targeted expression of tissue factor pathway inhibitor in a murine model of arterial thrombosis. *Thromb Haemost* 92:495–502.
93. Cockerill GW, Rye K-A, Gamble JR, et al. (1995) High-Density Lipoproteins Inhibit Cytokine-Induced Expression of Endothelial Cell Adhesion Molecules. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 15:1987–1994.
94. Parthasarathy S, Barnett J, Fong LG (1990) High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1044:275–283.
95. ANSM (2005) Prise en charge thérapeutique du patient dyslipidémique.
96. Grundy SM, Bilheimer D, Chait A, et al (1993) SUMmary of the second report of the national cholesterol education program (ncep) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel ii). *JAMA* 269:3015–3023.
97. ANSM (2011) Analyse des ventes de médicaments aux officines et hôpitaux en France, 1999-2009.
98. Les médicaments remboursés par le Régime Général d'Assurance maladie au cours des années 2004-2009. (2010) CNAMTS (Caisse Nationale de l'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés), [http://www.ameli.fr/fileadmin/user\\_upload/documents/MEDICAM\\_2004-2009.zip](http://www.ameli.fr/fileadmin/user_upload/documents/MEDICAM_2004-2009.zip)
99. The Expert Panel, Goodman DS, Hulley SB, et al. (1988) Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. *Archives Internal Medicine* 148:36–69.

100. (1988) Current status of blood cholesterol measurement in clinical laboratories in the United States: a report from the Laboratory Standardization Panel of the National Cholesterol Education Program. *Clinical Chemistry* 34:193–201.
101. ANSM (2010) Annales du contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale.
102. Srisawasdi P, Kroll MH, Lolekha PH (2007) Advantages and disadvantages of serum cholesterol determination by the kinetic vs the end point method. *American Journal of Clinical Pathology* 127:906–918.
103. Ignazi G (1966) Réflexométrie cutanée d'enfants mélanos-africains et européens. *bmsap* 9:123–135.
104. Notice technique "VITROS Chemistry Products CHOL Slides" Ortho-Clinical Diagnostics.
105. Pesce M, Bodourian S (1977) Enzymic measurement of cholesterol in serum with the Centrifichem centrifugal analyzer. *Clinical Chemistry* 23:280–282.
106. Fingerhut B (1978) Enzymic serum cholesterol measurement with a basic autoanalyzer and Du Pont aca method. *Clinical Chemistry* 24:1624–1627.
107. Witte D, Brown L, Feld R (1978) Effects of bilirubin on detection of hydrogen peroxide by use of peroxidase. *Clinical Chemistry* 24:1778–1782.
108. Liebermann NC (1885) Über das oxychinoterpen. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 1803–1809.
109. Burchard H (1890) Beiträge zur Kenntnis des Cholesterins. *Chem Zentralbl* 25–27.
110. Abel LL, Levy BB, Brodie BB, Kendall FE (1952) A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. *The Journal of biological chemistry* 195:357–366.
111. Edwards SH, Kimberly MM, Pyatt SD, et al. (2011) Proposed Serum Cholesterol Reference Measurement Procedure by Gas Chromatography-Isotope Dilution Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry* 57:614–622.
112. Cohen A, Hertz HS, Mandel J (1980) Total serum cholesterol by isotope dilution/mass spectrometry: A candidate definitive method. *Clinical Chemistry* 26:854–860.
113. Ellerbe P, Meiselman S, Sniegowski LT, et al. (1989) Determination of serum cholesterol by a modification of the isotope dilution mass spectrometric definitive method. *Analytical Chemistry* 61:1718–1723.
114. Mathian B, Pallant A, Delay M, Patricot MC (2000) Measurement of steroids by isotope dilution - Mass fragmentography in biological samples. *Dosage des stéroïdes dans les milieux biologiques par fragmentographie de masse avec dilution isotopique - Intérêt* 15:169–176.
115. Eckfeldt JH, Lewis LA, Belcher JD, et al. (1991) Determination of serum cholesterol by isotope dilution mass spectrometry with a benchtop capillary gas chromatograph/mass spectrometer: Comparison with the National Reference System's Definitive and Reference Methods. *Clinical Chemistry* 37:1161–1165.
116. Kock R, Delvoux B, Greiling H (1997) Determination of total cholesterol in serum by liquid chromatography- isotope dilution mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 43:1896–1903.

117. Wolff Briche CSJ, Carter D, Webb KS (2002) Comparison of gas chromatography and liquid chromatography mass spectrometric measurements for high accuracy analysis of cholesterol in human serum by isotope dilution mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 16:848–853.
118. Gambert P, Lallemand C, Archambault A (1979) Assessment of serum cholesterol by two methods: Gas liquid chromatography on a capillary column and chemical ionization mass fragmentography with isotopic dilution of [3,413C]cholesterol as internal standard. *Journal of Chromatography* 162:1–6.
119. Stockl D, Reinauer H (1993) Candidate reference methods for determining target values for cholesterol, creatinine, uric acid, and glucose in External Quality Assessment and internal accuracy control. I. Method setup. *Clinical Chemistry* 39:993–1000.
120. Thienpont LM, De Leenheer AP, Stockl D, Reinauer H (1993) Candidate reference methods for determining target values for cholesterol, creatinine, uric acid, and glucose in external quality assessment and internal accuracy control. II. Method transfer. *Clinical Chemistry* 39:1001–1006.
121. Siekmann L, Hueskes KP, Breuer H (1976) Determination of cholesterol in serum using mass fragmentography: a reference method in clinical chemistry. *Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie* 279:145–146.
122. Derks HJGM, Van Heiningen A, Koedam HC (1985) Gas-chromatographic determination of cholesterol in serum: Candidate reference method. *Clinical Chemistry* 31:691–694.
123. Henrion A (1994) Reduction of systematic errors in quantitative analysis by isotope dilution mass spectrometry (IDMS): an iterative method. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 350:657–658.
124. Liste des matériaux de référence validées par le JCTLM pour le dosage du cholestérol (cholesterol total, LDL-C et HDL-C). <http://www.bipm.org/jctlm/home.do?lang=fr>.
125. Bachorik P, Ross J (1995) National Cholesterol Education Program recommendations for measurement of low-density lipoprotein cholesterol: executive summary. The National Cholesterol Education Program Working Group on Lipoprotein Measurement. *Clinical Chemistry* 41:1414–1420.
126. (1995) National Cholesterol Education Program Working Group on Lipoprotein Measurement. Recommendations on lipoprotein measurement. National Institutes of Health, (NIH Publication No. 95-3044)
127. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS (1972) Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clinical Chemistry* 18:499–502.
128. Arrêté du 20 septembre 2005 modifiant l'arrêté du 3 avril 1995 fixant la Nomenclature des actes de biologie médicale, (2005) Ministère de la santé et des solidarités.
129. Siekmeier R, Marz W, Gross W (1990) Insufficient accuracy and specificity of polyanion precipitation methods for quantifying low-density lipoproteins. *Clinical Chemistry* 36:2109–2113.

130. Rifai N, Warnick G, McNamara J, et al. (1992) Measurement of low-density-lipoprotein cholesterol in serum: a status report. *Clinical Chemistry* 38:150–160.
131. Pisani T, Pickering S, Deluca LW, Gebiski P (1996) Performance of a direct LDL-cholesterol method compared to beta quantification. *Pure and applied chemistry* 68:1887–1892.
132. Panteghini M (2001) Recent advances in the measurement of LDL cholesterol in serum. *Laboratoriums Medizin* 25:284–287.
133. McNamara J, Cole T, Contois J, et al. (1995) Immunoseparation method for measuring low-density lipoprotein cholesterol directly from serum evaluated. *Clinical Chemistry* 41:232–240.
134. Maitra A, Hirany SV, Jialal I (1997) Comparison of two assays for measuring LDL cholesterol. *Clinical Chemistry* 43:1040–1047.
135. Miller WG, Waymack PP, Anderson FP, et al. (2002) Performance of Four Homogeneous Direct Methods for LDL-Cholesterol. *Clinical Chemistry* 48:489–498.
136. Nauck M, Warnick GR, Rifai N (2002) Methods for measurement of LDL-cholesterol: A critical assessment of direct measurement by homogeneous assays versus calculation. *Clinical Chemistry* 48:236–254.
137. Sugiuchi H, Irie T, Uji Y, et al. (1998) Homogeneous assay for measuring low-density lipoprotein cholesterol in serum with triblock copolymer and  $\beta$ -cyclodextrin sulfate. *Clinical Chemistry* 44:522–531.
138. Nauck M, Graziani MS, Bruton D, et al. (2000) Analytical and Clinical Performance of a Detergent-based Homogeneous LDL-Cholesterol Assay: A Multicenter Evaluation. *Clinical Chemistry* 46:506–514.
139. Esteban-Salàjn M, Guimòn-Bardesi A, de la Viuda-Unzueta JM, et al. (2000) Analytical and Clinical Evaluation of Two Homogeneous Assays for LDL-Cholesterol in Hyperlipidemic Patients. *Clinical Chemistry* 46:1121–1131.
140. Rifai N, Iannotti E, DeAngelis K, Law T (1998) Analytical and clinical performance of a homogeneous enzymatic LDL-cholesterol assay compared with the ultracentrifugation-dextran sulfate-Mg<sup>2+</sup> method. *Clinical Chemistry* 44:1242–1250.
141. Fei H, Maeda S, Kirii H, et al. (2000) Evaluation of Two Different Homogeneous Assays for LDL-Cholesterol in Lipoprotein-X-positive Serum. *Clinical Chemistry* 46:1351–1356.
142. Okada M, Matsui H, Ito Y, et al. (1998) Low-density lipoprotein cholesterol can be chemically measured: A new superior method. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 132:195–201.
143. Sakaue T, Hirano T, Yoshino G, et al. (2000) Reactions of direct LDL-cholesterol assays with pure LDL fraction and IDL: comparison of three homogeneous methods. *Clinica Chimica Acta* 295:97–106.
144. Miller WG, Myers GL, Sakurabayashi I, et al. (2010) Seven direct methods for measuring HDL and LDL cholesterol compared with ultracentrifugation reference measurement procedures. *Clinical Chemistry* 56:977–986.



145. Esteban-Salan M, Aguilar-Doreste JA, Arranz-Pena ML, et al. (2008) Multicentric evaluation of the homogeneous LDL-cholesterol Plus assay: comparison with beta-quantification and Friedewald formula. *Clinical Biochemistry* 41:1402–1409.
146. Mora S, Rifai N, Buring JE, Ridker PM (2009) Comparison of LDL cholesterol concentrations by Friedewald calculation and direct measurement in relation to cardiovascular events in 27,331 women. *Clinical Chemistry* 55:888–894.
147. Ragland BD, Konrad RJ, Chaffin C, et al. (2000) Evaluation of a homogeneous direct LDL-cholesterol assay in diabetic patients: effect of glycemic control. *Clinical Chemistry* 46:1848–1851.
148. Hirany S, Li D, Jialal I (1997) A more valid measurement of low-density lipoprotein cholesterol in diabetic patients. *American Journal of Medicine* 102:48–53.
149. Schaefer EJ, Otokozawa S, Ai M (2011) Limitations of Direct Methods and the Reference Method for Measuring HDL and LDL Cholesterol. *Clinical Chemistry* 57:1081–1083.
150. Bachorik P (2000) Measurement of low-density-lipoprotein cholesterol. In: Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH (ed) *Handbook of lipoprotein testing* 2<sup>nd</sup> Edition. AACC, pp 245–263
151. Grundy S, Bilheimer D, Chait A, et al (1993) Summary of the second report of the national cholesterol education program (ncep) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel ii). *JAMA* 269:3015–3023.
152. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (2001) Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285:2486–2497.
153. Warnick GR, Nauck M, Rifai N (2001) Evolution of Methods for Measurement of HDL-Cholesterol: From Ultracentrifugation to Homogeneous Assays. *Clinical Chemistry* 47:1579–1596.
154. Burstein M, Samaille J (1960) Sur un dosage rapide du cholestérol lié aux  $\alpha$ -et aux  $\beta$ -lipoprotéines du sérum. *Clinica Chimica Acta* 5:609.
155. Kakuyama, T, Kimura S, Hasiguchi Y (1994) Fully automated determination of HDL-cholesterol from human serum with Hitachi 911. *Clinical Chemistry* 40:1104.
156. Annales du Contrôle National de Qualité des Analyses de Biologie Médicale <http://ansm.sante.fr/> Accès en septembre 2013.
157. Sugiuchi H, Uji Y, Okabe H, et al. (1995) Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated  $\alpha$ -cyclodextrin. *Clinical Chemistry* 41:717–723.
158. (2007) Rapport du contrôle de marché des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro de dosage du cholestérol-HDL. ANSM
159. Nauck M, Wiebe D, Warnick GR (2000) Measurement of High-Density-Lipoprotein Cholesterol. In: Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH (ed) *Handbook of lipoprotein testing* 2<sup>nd</sup> Edition. AACC, pp 221–244
160. Malloy MJ, Kane JP (2001) A risk factor for atherosclerosis: triglyceride-rich lipoproteins. *Advances in Internal Medicine* 47:111–136.

161. Fossati P, Prencipe L (1982) Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clinical Chemistry* 28:2077–2080.
162. Jellum E, Bjørnstad P (1964) Quantitative gas-liquid chromatographic determination of free glycerol in blood serum. *The Journal of Lipid Research* 5:314–317.
163. Ellerbe P, Sniegowski LT, Welch MJ (1995) Isotope dilution mass spectrometry as a candidate definitive method for determining total glycerides and triglycerides in serum. *Clinical Chemistry* 41:397–404.
164. Edwards SH, Stribling SL, Pyatt SD, Kimberly MM (2012) Reference Measurement Procedure for Total Glycerides by Isotope Dilution GC-MS. *Clinical Chemistry* 58:768–776.
165. Kimberly MM, Myers GL, Little RR (2004) Clinical Laboratory Reference Networks. *Accreditation and Quality Assurance* 9:18–23.
166. NF EN ISO 15195 (2004) Médecine de laboratoires -- Exigences pour les laboratoires réalisant des mesurages de référence.
167. ISO/IEC Guide 98 (2008) Guide to the expression of uncertainty in measurement.
168. (2010) CLSI document C53-A. Characterization and Qualification of Commutable Reference Materials for Laboratory Medicine; Approved guidelines. Wayne, PA, USA.
169. Gautier T, Masson D, Barros J-PP de, et al. (2000) Human Apolipoprotein C-I Accounts for the Ability of Plasma High Density Lipoproteins to Inhibit the Cholesteryl Ester Transfer Protein Activity. *The Journal of Biological Chemistry* 275:37504–37509.



## ***ANNEXES***



## Annexe 1 : Evaluation des incertitudes selon la méthode du GUM

L'évaluation des incertitudes selon la méthode préconisée par le GUM est basée sur quatre étapes qui sont : la modélisation du processus de mesure, l'évaluation des incertitudes-types sur les grandeurs d'entrée du modèle, la propagation des incertitudes sur les grandeurs d'entrées et l'expression de l'incertitude élargie.

### 1. Modélisation du processus de mesure

Le processus de mesure est modélisé sous forme mathématique de manière à combiner toutes les informations pour calculer le résultat, par exemple si une droite d'étalonnage est mise en œuvre (Equation 9). Les coefficients a et b de la droite d'étalonnage sont déterminés ainsi que leurs incertitudes par la méthode des moindres carrés.

$$C_{M/éch} = \frac{C_{M^*/éch} \times m_{M^*/éch}}{m_{éch}} \times Q_{éch} \times f_{Q_{étal}} + f_F \quad \text{Équation (9)}$$

Avec :

$$Q_{éch} = a \times R_{éch} + b$$


$$C_{M^*/éch} = f_{dil^*} \times C_{réf^*}$$

Avec :

- $C_{M/éch}$  : concentration ou fraction de la molécule M dans l'échantillon
- $C_{M^*/éch}$  : concentration ou fraction de la molécule M\* dans la solution introduite dans l'échantillon
- $m_{M^*/éch}$  : masse de solution de M\* ajoutée à l'échantillon
- $m_{éch}$  : masse prélevée d'échantillon
- $Q_{éch}$  : rapport de quantité de matière dans l'échantillon
- $f_{Q_{étal}}$  : facteur de correction lié à l'incertitude de la concentration des solutions étalon
- $f_F$  : facteur de correction lié à la fidélité intermédiaire
- $R_{éch}$  : rapport de l'aire du signal correspondant à A sur l'aire du signal correspondant à B dans l'échantillon
- $f_{dil^*}$  : facteur de dilution qui tient compte de la préparation de la solution M\* introduite dans l'échantillon à partir d'une solution mère de molécule marquée
- $C_{réf^*}$  : concentration ou fraction d'une solution mère de molécule marquée ou d'une solution préparée à partir d'un composé « pur » ( $C_{réf^*} = \text{pureté} \times (m_{\text{produit pur}^*} / m_{\text{totale solution}})$ )

## 2. Evaluation des incertitudes-types sur les grandeurs d'entrée du modèle

A chaque paramètre du modèle mathématique est associée son incertitude-type. Elle peut être type A pour des valeurs issues de l'expérience ou de type B pour des valeurs prédéfinies. A chaque incertitude-type est associée une loi de distribution qui représente la répartition des valeurs selon la probabilité de présence (Tableau 26).

Source d'incertitude	Type d'évaluation	Demi-étendue	Loi	Incertitude type
Pureté de l'étalon : <b>Réf</b> (cf. certificat)	B	a	 (uniforme)	$a/\sqrt{3}$ kg/kg ou %
Pesées: <b>m<sub>i</sub></b>	B	/	K=1	$u(m_i)$
Rapport des aires : <b>R<sub>j</sub></b>	A	/	/	$s_{R_j} / \sqrt{m}$
Rapport des quantités de matière : <b><math>\hat{R}_Q</math></b>	A	/	/	$u(\hat{R}_Q)$
Fidélité de la méthode : écart-type des p déterminations	A	/	/	$s_R / \sqrt{p}$

**Tableau 26 : Récapitulatif des expressions mathématiques des incertitudes en fonction de la source.**

L'incertitude est déterminée à partir de la loi de propagation sur les paramètres intervenant dans le calcul de la concentration et de la fidélité.

Pour prendre en compte l'incertitude sur les solutions étalons (qui n'entre pas dans le calcul de l'incertitude sur  $R_Q$  par la droite d'étalonnage), le rapport est défini par :

$$R_Q = R_{1Q} \times R_{2Q}$$

Avec :

- $R_{1Q}$  : Rapport issu de la droite de calibration
- $R_{2Q}$  : Valant 0 mais dont l'incertitude est celle des solutions étalon.

L'incertitude sur  $R_{1Q}$  est obtenue à partir de l'Equation 10.

$$u(\hat{Y})_{\text{mod } \text{ele}} = S_{y/x} \times \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(x_p - \bar{x})^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Équation (10)}$$

Avec l'écart-type sur les résidus :

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

### 3. Propagation des incertitudes sur les grandeurs d'entrées

La propagation des incertitudes sur les grandeurs d'entrées permet d'estimer l'incertitude sur le résultat de mesure selon la loi suivante :

$$u_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^N \left( \frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 \times u^2(x_i) + 2 \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N \left( \frac{\partial f}{\partial x_i} \right) \left( \frac{\partial f}{\partial x_j} \right) u(x_i, x_j)}$$

### 4. Expression de l'incertitude élargie

L'incertitude élargie est déterminée selon la formule :

$$U(y) = k u_c(y)$$

Avec :

- $U(y)$  : incertitude élargie
- $u_c(y)$  : incertitude composée
- $k$  : facteur d'élargissement

$k$  est déterminé à partir de la table de Student, pour un niveau de confiance de 95 % et pour un nombre de degrés de liberté  $v_{\text{eff}}$  calculé selon la formule suivante :



$$v_{\text{eff}} = \frac{u_c^2}{\sum \frac{u_i^4}{v_i}}$$

- $u_i$  : incertitude-type associée à la  $i^{\text{ème}}$  variable
- $v_i$  : nombre de degré de libertés associé à la  $i^{\text{ème}}$  variable

## **Annexe 2 : Produits et équipements**

### **1. Réactifs**

- Pyridine anhydre, pureté minimale 99,8 % (Sigma Aldrich)
- MSTFA (N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoro-acetamide) derivatization grade (Sigma Aldrich)
- Acétate d'éthyle de grade HPLC (Sigma Aldrich)
- Tampon Tris HCl de pH 10, 10X (Sigma Aldrich)
- Triton X100 (Sigma Aldrich)
- Bicarbonate de sodium (Sigma Aldrich)
- anhydride acétique (Sigma Aldrich)
- Ethanol absolu, pureté minimale 99.9 % (VWR)
- Méthanol, pureté minimale 97 % (Sigma Aldrich)
- Hexane, pureté minimale 97 % (Sigma Aldrich)
- Hydroxyde de potassium, pureté minimale 85 % (VWR)

### **2. Composés marqués**

- [3,4-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-cholestérol, pureté minimale de marquage 99 % (Sigma Aldrich)
- [<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]-trioléine, pureté minimale de marquage 99% (Sigma Aldrich)

### **3. Matériaux de référence certifiés**

- NIST SRM 911c « *cholestérol* »
- NIST 909c « *Sérum humain* », échantillon de sérum congelé
- NIST SRM 1951b « *Lipides dans sérum humain* », échantillon de deux niveaux de sérum congelé

### **4. Equipements**

- Chromatographe en phase gazeuse Agilent 6890N couplé à un spectromètre de masse Agilent 5975B.
- Colonne capillaire apolaire DB5-MS (5 % Phényl – 95 % diméthylpolysiloxane) (30 m x 250 µm x 0.25 µm)
- Ultracentrifugeuse: sorval mTX150 avec rotor S100 AT4 (Thermo Scientific)
- Centrifugeuse : centrifuge 5418 (Eppendorf)
- Balance de portée 20 g avec une résolution de 1 µg
- Balance de portée 200 g avec une résolution de 10 µg
- Densimètre Anton Paar DEN 4500

### Annexe 3 : Méthode de quantification

La quantification est utilisée est réalisée en méthode SIM par dilution isotopique. Une droite d'étalonnage est obtenue en traçant le rapport des quantités de molécules non marquées et marquées en fonction du rapport des aires de pics de leurs ions majoritaires respectifs.

$$Q = f(R_{\text{aires}})$$

Avec :

$$Q = \frac{m_M}{m_{M^*}}$$

$$R_{\text{aires}} = \frac{\text{Aire}_M}{\text{Aire}_{M^*}}$$

Avec :

- $m_M$  : masse de la molécule non-marquée
- $m_{M^*}$  : masse de la molécule marquée
- $\text{Aire}_M$  : aire du pic correspondant à la molécule non-marquée
- $\text{Aire}_{M^*}$  : aire du pic correspondant à la molécule marquée

Pour tenir compte des contributions respectives de la molécule marquée ( $M^*$ ) dans l'aire du pic correspondant à la molécule non-marquée ( $M$ ) et inversement, les aires de pic de la molécule marquée et de la molécule non-marquée sont corrigées. Pour cela, on définit les ratios  $R$  suivants en analysant en mode SIM les composés seuls trois fois minimum. L'ion majoritaire de  $M$  correspond au fragment A et l'ion majoritaire de  $M^*$  correspond au fragment B.

$$R_M = \frac{\text{Aire}_{B/M}}{\text{Aire}_{A/M}} \quad R_{M^*} = \frac{\text{Aire}_{A/M^*}}{\text{Aire}_{B/M^*}}$$

Avec :

- $R_M$  : proportion de B par rapport à A dans la molécule M
- $R_{M^*}$  : proportion de A par rapport à B dans la molécule  $M^*$
- $Aire_{B/M}$  : aire du fragment B dans la molécule M
- $Aire_{A/M}$  : aire du fragment A dans la molécule M
- $Aire_{A/M^*}$  : aire du fragment A dans la molécule  $M^*$
- $Aire_{B/M^*}$  : aire du fragment B dans la molécule  $M^*$

Que ce soit dans l'échantillon ou dans la solution étalon, les rapports entre les aires de pic de la molécule M et de la molécule  $M^*$  sont corrigés selon l'équation suivante :

$$R_{Aires} = \frac{Aire_A - R_{M^*} \times Aire_B}{Aire_B - R_M \times Aire_A}$$

Avec :

- $R_{Aires}$  : rapport corrigé de l'aire de pic du fragment A du à la molécule M sur l'aire de pic du fragment B du à la molécule  $M^*$
- $Aire_A$  : aire du pic du fragment A dans la solution étalon ou échantillon
- $Aire_B$  : aire du pic du fragment B dans la solution étalon ou échantillon
- $R_{M^*}$  : proportion de A par rapport à B dans la molécule  $M^*$
- $R_M$  : proportion de B par rapport à A dans la molécule M

La fraction massique de l'échantillon est définie à partir des aires de pic des solutions échantillons et de la droite d'étalonnage selon l'équation suivante.

$$C_{M/éch} = \frac{C_{M^*/éch} \times m_{M^*/éch}}{m_{éch}} \times Q_{éch} \times f_{Q_{étal}} + f_F$$

Avec :

$$Q_{éch} = a \times R_{éch} + b$$

$$C_{M^*/éch} = f_{dil^*} \times C_{réf^*}$$

Avec :

- $C_{M/éch}$  : concentration ou fraction de la molécule M dans l'échantillon
- $C_{M^*/éch}$  : concentration ou fraction de la molécule M\* dans la solution introduite dans l'échantillon
- $m_{M^*/éch}$  : masse de solution de M\* ajoutée à l'échantillon
- $m_{éch}$  : masse prélevée d'échantillon
- $Q_{éch}$  : rapport de quantité de matière dans l'échantillon
- $f_{Qétal}$  : facteur de correction lié à l'incertitude de la concentration des solutions étalon
- $f_F$  : facteur de correction lié à la fidélité intermédiaire
- $R_{éch}$  : rapport de l'aire du signal correspondant à A sur l'aire du signal correspondant à B dans l'échantillon
- $f_{dil^*}$  : facteur de dilution qui tient compte de la préparation de la solution M\* introduite dans l'échantillon à partir d'une solution mère de molécule marquée
- $C_{réf^*}$  : concentration ou fraction d'une solution mère de molécule marquée ou d'une solution préparée à partir d'un composé « pur » ( $C_{réf^*} = \text{pureté} \times (m_{\text{produit pur}^*} / m_{\text{totale solution}})$ )

$$C_{\text{Molaire M/éch}} = \frac{C_{M/éch} \times \rho_{\text{sérum}}}{M_M}$$

Avec :

- $C_{\text{Molaire M/éch}}$  : concentration molaire de M dans l'échantillon (mol / dm<sup>3</sup>)
- $C_{M/éch}$  : fraction massique de M dans l'échantillon (g / g)
- $\rho_{\text{sérum}}$  : masse volumique du sérum (g / dm<sup>3</sup>)
- $M_M$  : masse molaire de M (g / mol)

## Annexe 4 : Budget d'incertitude du cholestérol total

### 1. Budget global d'incertitude

incertitude finale cholesterol total : échantillon NIST 1951b L1				
Fichier :	D:\DIVERS\rapport bibio\chap1 validation methodes\incertitude CT validation\NIST L1-11\Inc			
Titre de l'étude :	incertitude finale cholesterol total : échantillon NIST 1951b L1			
Fichier Modèle :				
Commentaires :				
<b>Définition des variables :</b>				
Code	Description	Valeur	Méthode	Inc
Cspike	Cspike : concentration en cholestérol marqué	1.2843879E+003 µg/g	Personnalisée	0.0 µg/g
M13	M13 : masse du flacon vide (prépa ech)	1.729361000E+001 g	Personnalisée	1.3000E-004 g
M14	M14 : masse du flacon vide + serum (prépa ech)	1.740279667E+001 g	Personnalisée	1.3000E-004 g
M15	M15 : masse du flacon vide + serum + spike (prépa ech)	1.756203330E+001 g	Personnalisée	1.3000E-004 g
F	F : fidélité	0.0	Personnalisée	4.90E+001
Qlin	Qlin : rapport de quantité issue de la linéarité	9.71556599E-001	Personnalisée	2.006077E-003
Q'etal	Q'etal: rapport de qté de matière dans l'étalon	1.000000E+000	Personnalisée	2.135E-003
d	d : masse volumique du sérum	1.022367352E+000 kg/L	Personnalisée	1.9716305E-003 kg/L
Mchol	Mchol: Masse molaire du cholestérol	3.866535E+002 g/mol	Personnalisée	5E-004 g/mol
deau	deau : masse volumique de l'eau	9.98200000000E-001 kg/L	Personnalisée	5.000000E-005 kg/L
Fresus	Fresus : facteur correctif de resuspension	1E+000	Personnalisée	0.0
<b>Inc</b>				
Méthode Numérique				
Inc				
Code	Nom	Expression	Valeur	Inc
Q	Qlin*Q'etal	Qlin*Q'etal	9.71556599E-001	5.771991E-003 (k = 2)
Cecht	concentration en cholestérol dans l'échantillon	(((Fresus*(M15-M14)*Cspike*Q)/(M14-M13))*1000*d)/Mchol)+F	4.811967605E+003 µmol/L	1.064511031E+002 µmol/L (k = 2)
<b>Bilan par composantes :</b>				
<b>Q</b>				
Variable	Sensibilité C(Xi)	C(Xi).u(Xi)	Poids	
Qlin	1.00000E+000	2.006E-003	48.32%	
Q'etal	9.71557E-001	2.075E-003	51.68%	
<b>Cecht</b>				
Variable	Sensibilité C(Xi)	C(Xi).u(Xi)	Poids	
11/09/2013			Page 1/2	

**incertitude finale cholesterol total : échantillon NIST 1951b L1**

Fresus	non calculé	0.0	0.00%
M15	3.02190E+004	3.92847E+000	0.54%
M14	-7.42901E+004	-9.65771E+000	3.29%
Cspike	non calculé	0.0	0.00%
Qlin	4.95284E+003	9.93579E+000	3.48%
Q'etal	4.81197E+003	1.02760E+001	3.73%
M13	4.40711E+004	5.72924E+000	1.16%
d	4.70669E+003	9.27986E+000	3.04%
Mchol	-1.24452E+001	-6.223E-003	0.00%
F	1.00000E+000	4.90000E+001	84.75%

**Corrélation des fonctions :**

F1	F2	r(F1,F2)
Q	Cecht	0.269

## 2. Budget d'incertitude lié à la préparation des étalons

Qetal: préparation des solutions étalons Cholestérol (DE-11)				
<b>Fichier :</b>	D:\DIVERS\rapport bibio\chap1 validation methodes\incertitude CT validation\NIST L1-11\Incertitude			
<b>Titre de l'étude :</b>	Qetal: préparation des solutions étalons Cholestérol (DE-11)			
<b>Fichier Modèle :</b>				
<b>Commentaires :</b>				
<b>Définition des variables :</b>				
Code	Description	Valeur	Méthode	Incertitude absolue
M01	M01 : Masse flacon vide (prépa solution mère cholestérol)	1.115684367E+002 g	Personnalisée	3.300E-004 g
M02	M02 : Masse flacon + 50mL Ethanol (prépa solution mère cholestérol)	1.5044417E+002 g	Personnalisée	3.3E-004 g
M03	M03 : Masse barquette + cholestérol (prépa solution mère cholestérol)	7.0145E+001 mg	Personnalisée	3.3E-002 mg
M04	M04 : Masse barquette + résidu (prépa solution mère cholestérol)	2.0387E+001 mg	Personnalisée	1.3E-002 mg
Cspike	Cspike : Concentration du spike en cholestérol marqué	1.2973615E+003 µg/g	Personnalisée	0.0 µg/g
Pureté	Pureté : Pureté du cholestérol non marqué	0.992	Uniforme	2E-003
M10	M10 : Masse flacon étalon vide (prépa solution étalon)	8.603930E+003 mg	Personnalisée	6.5E-002 mg
M11	M11 : Masse flacon étalon + spike (prépa solution étalon)	8.763440E+003 mg	Personnalisée	6.5E-002 mg
M12	M12 : Masse flacon étalon + spike + cholestérol (prépa solution étalon)	8.921670E+003 mg	Personnalisée	6.5E-002 mg
<b>Incertitudes sur les fonctions :</b> Méthode Numérique Incertitudes calculées sans les corrélations des variables				
Code	Nom	Expression	Valeur	Incertitude élargie U
Qetal	rapport quantité de matière dans les étalons	$1000 \cdot \text{Pureté} \cdot (M03 - M04) \cdot (M12 - M11) / (C\text{spike} \cdot (M02 - M01) \cdot (M11 - M10))$	9.70813710E-001	4.146746E-003 (k = 2)
<b>Bilan par composantes :</b>				
11/09/2013				Page 1/2



**Qetal: préparation des solutions étalons Cholestérol (DE-11)**

**Qetal**

Variable	Sensibilité C(Xi)	C(Xi).u(Xi)	Poids
Pureté	9.78643E-001	1.695E-003	66.84%
M03	1.9511E-002	6.44E-004	9.64%
M04	-1.9511E-002	-2.54E-004	1.50%
M12	6.135E-003	3.99E-004	3.70%
M11	-1.2222E-002	-7.94E-004	14.68%
Cspike	non calculé	0.0	0.00%
M02	-2.4972E-002	-8E-006	0.00%
M01	2.4972E-002	8E-006	0.00%
M10	6.086E-003	3.96E-004	3.64%

